

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Etude des flux de glucose et d'acides gras dans des pré-adipocytes 3T3-L1 soumis à une inhibition mitochondriale

Piens, Marie

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## ***I Introduction***

### ***I.1 L'obésité***

#### ***I.1.1 Généralités***

L'obésité, définie par un déséquilibre entre la prise et les dépenses énergétiques, est un problème de santé publique dont l'incidence ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés. En effet, elle touche plus de 18 % de la population mondiale dont plus de 20 % de la population américaine et un plus faible pourcentage pour la population européenne, ce qui représente une augmentation de 50 % sur les sept dernières années (Friedman, 2000). Considérée comme une pathologie par certains, l'obésité est caractérisée par une hypertrophie et une hyperplasie du tissu adipeux et est définie par un indice de masse corporelle supérieur ou égal à 30 (BMI : Body Mass Index). Sur base de cet indice représentant la masse divisée par la taille au carré ( $\text{kg/m}^2$ ), l'organisation mondiale de la santé a proposé une classification de la surcharge pondérale et de l'obésité pour les adultes (figure 1.1). De plus, on observe une corrélation entre un excès de graisse et l'apparition de maladies chroniques telles que l'hypertension, le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose.

Un individu adulte maintient généralement une même masse corporelle appelée *set point* grâce au système d'homéostasie énergétique. Représentant 15 à 20 % de la masse corporelle, la quantité de tissu adipeux varie d'une personne à l'autre en fonction de facteurs génétiques, psychologiques, physiologiques et environnementaux. Néanmoins, il existe un système de régulation hypothalamique très complexe qui est informé des changements métaboliques et qui contrôle la prise alimentaire et les dépenses énergétiques par voies endocriniennes (ortho/parasymphatique) (figure 1.2).

#### ***I.1.2 Facteurs influençant l'obésité***

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre la prise d'énergie, la mise en réserve et l'utilisation de cette énergie. Nous allons maintenant décrire quelques facteurs responsables ou associés à l'état d'obésité.

### I.1.2.1 Facteurs génétiques

Pour la contribution et les effets de mutations géniques dans l'apparition de l'obésité, il faut distinguer les hypothèses mono- et polygéniques. Onze gènes responsables des formes monogéniques de l'obésité ont été identifiés chez la souris (figure 1.3). Parmi ces gènes, citons ceux codant la leptine (*ob*) ou son récepteur (*db*), la carboxypeptidase E qui intervient dans la synthèse de neuropeptides et ceux d'hormones, le gène codant le récepteur MC4R exprimé par les neurones hypothalamiques et pour les protéines *tubby* qui sont des facteurs de transcription hypothalamiques (Barsh *et al.*, 2000). Bien que des mutations dans un certain nombre de gènes soient observées dans différents modèles d'animaux obèses et responsables de l'obésité, celles-ci s'avèrent très rares dans la population obèse humaine. Jusqu'à présent, seules les mutations géniques survenant dans les séquences codant pour les récepteurs de la leptine et du MC4R sont connues pour contribuer au phénotype obèse chez l'homme.

### I.1.2.2 Autres facteurs associés

La surcharge pondérale est souvent associée à un trouble du comportement menant à la malnutrition. Certaines perturbations d'ordre psychologiques peuvent être une cause associée à l'obésité. La mauvaise éducation alimentaire dès le plus jeune âge ainsi que l'offre commerciale de cuisine préparée hypercalorique et riche en lipides contribuent également à l'augmentation de la masse du tissu adipeux. L'activité physique, la seule manière de dépenser volontairement de l'énergie est souvent négligée par les individus obèses.

L'évolution du tissu adipeux nécessite l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie de cellules hautement différenciées : les adipocytes. Nous allons passer en revue les étapes importantes impliquées dans la différenciation de ces cellules, encore appelée adipogenèse.

### I.1.3 *Le tissu adipeux*

On distingue deux types de tissus adipeux : les graisses brune et blanche. Longtemps considéré comme un simple lieu de stockage des lipides de réserves tels que les TAG (Triacylglycérols), le tissu adipeux blanc possède également une activité métabolique intense, ainsi qu'une fonction sécrétoire endo- auto- et paracrine. Le tissu adipeux brun quant à lui est essentiellement impliqué dans la thermogenèse (Hamann *et al.*, 1996).

Abondante chez le fœtus et chez les mammifères hibernants, la graisse brune disparaît au cours du développement chez de nombreuses espèces dont l'homme. Les adipocytes bruns contiennent une quantité importante de mitochondries dont la fonction essentielle est de produire de la chaleur. C'est une protéine de la membrane mitochondriale interne (MMI) UCP-1 (Uncoupling Protein-1) qui est responsable de cette dissipation de chaleur, libérée lors du découplage entre le potentiel électrochimique créé par la respiration mitochondriale et les phosphorylations oxydatives mitochondriales, empêchant ainsi la production d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate).

Le tissu adipeux blanc est quant à lui réparti en quatre classes : profonds ou androïdes (périrénaux, péristomacaux et mésentérique) dont l'accumulation est associée aux facteurs de risques des pathologies associées à l'obésité. On notera également le tissu adipeux intra et intermusculaires, sous cutanés et de la moelle osseuse. De manière générale, l'étape de développement des adipocytes comprend trois grandes étapes : la synthèse, le stockage et de libération de lipides. En effet, ces cellules accumulent près de 95 % des triacylglycérols (TAG) stockés dans l'organisme. Les deux autres voies métaboliques seront détaillées au point I.4.4 de ce travail. On trouve également au sein du tissu adipeux blanc des protéines découplantes homologues à UCP-1, retrouvé dans la graisse brune. La protéine UCP-2 (Uncoupling Protein 2) est un protonophore ubiquiste alors qu'UCP-3 (Uncoupling Protein 3) n'est exprimée que dans le muscle strié squelettique et l'adipocyte. La régulation de l'expression des UCPs est assurée par différents facteurs et leur activité est inhibée par le guanosine diphosphate (GDP) et activée par les acides gras (Klingenberg *et al.*, 2001).

### *I.1.4 Le tissu adipeux en tant que glande endocrine*

En réponse à certains stimuli extracellulaires et changements métaboliques, le tissu adipeux blanc répond comme un organe endocrinien en libérant une série de molécules appelées '*adipokines*' qui influencent le métabolisme énergétique.

Parmi ces adipokines, de nombreuses recherches portent sur la leptine. Cette hormone, d'abord décrite pour sa fonction sur l'hypothalamus, a également une action sur le tissu musculaire et adipeux (Minokoshi *et al.*, 2002). En effet, cette protéine est sécrétée par les adipocytes, proportionnellement à l'importance du tissu adipeux. Transportée par le sang, elle agit comme une hormone de satiété en régulant l'appétit et les dépenses énergétiques par une rétro-action hypothalamique (Schwartz *et al.*, 2000). Le circuit régulant la prise

alimentaire et les dépenses énergétiques est présenté à la figure 1.4. La leptine active le système anorexigène (inhibant l'appétit) en stimulant les neurones les POMC (Proopiomelanocortin) qui libèrent alors de la MSH $\alpha$  (Melanin Stimulating Hormone  $\alpha$ ) agissant au niveau de son récepteur hypothalamique (MC4-R). Elle inhibe le système orexigène (stimulant l'appétit) par stimulation des neurones libérant le NPY (Neuropeptide Y) et l'AgRP (Agouti- Related Protein). La leptine favorise également les dépenses énergétiques en favorisant la  $\beta$ -oxydation des acides gras au niveau des muscles striés squelettiques. Elle empêcherait donc l'accumulation de TAG au sein de cellules comme les hépatocytes et les cardiomyocytes, cellules non destinées à ce stockage. Cette accumulation non adipeuse de TAG est appelée lipotoxicité et entraîne certains effets liés au diabète de type II dont la résistance à l'insuline (pour des revues récentes : (Friedman, 2002) (Minokoshi *et al.*, 2002)).

L'adiponectine ou Acrp 30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), composée d'un domaine amino-terminal collagen-like (cAd) et d'un domaine globulaire carboxy-terminal (gAd), réduit l'accumulation de TAG dans le muscle strié squelettique. En effet, cette hormone stimule l'expression de molécules impliquées dans le transport et la  $\beta$ -oxydation des acides gras ainsi que dans la dissipation d'énergie telles que respectivement la FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase), l'ACD (Acyl-CoA Déshydrogénase) et l'UCP-2 (Saltiel, 2001). Des données montrent également que Acrp 30 inhibe la libération de glucose par les hépatocytes en augmentant la sensibilité de cet organe envers l'insuline (Yamauchi *et al.*, 2001) (Berg *et al.*, 2001).

L'adipsine est un facteur autocrine qui favorise la synthèse des TAG en stimulant l'estérification des acides gras ainsi que le transport du glucose dans les adipocytes (figure 1.5). L'adipocyte sécrète les facteurs D (adipsine), B et C<sub>3</sub> du système du complément. En présence de chylomicrons et du facteur B, l'adipsine (protéase à sérine) clive une partie du facteur C<sub>3</sub> pour produire du C<sub>3a</sub> qui réagit avec la carboxypeptidase afin de former la désarginine C<sub>3a</sub>. Identique à une protéine présente dans le plasma sanguin, appelée protéine de stimulation de l'acylation (ASP pour acylation stimulating protein), elle stimule non seulement l'estérification des acides gras mais aussi le transport du glucose dans les adipocytes (Tao *et al.*, 1997) (Cianflone, 1997).

Comme nous le savons, les adipocytes possèdent une activité sécrétrice endocrine et quand ce tissu se trouve en excès, il joue un rôle direct dans différentes pathologies. Son rôle dans le diabète de type II ne sera pas développé dans cette introduction. Mentionnons simplement que :

Les adipocytes blancs constituent une source importante d'angiotensinogène, précurseur de l'angiotensine II qui participe à l'hyperplasie adipocytaire via la PGI<sub>2</sub> (prostacycline) mais aussi à l'augmentation de la pression artérielle.

Le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) produit par la graisse abdominale contribue au risque vasculaire en favorisant l'aggrégation plaquettaire.

La sécrétion de la cytokine TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) provoque un dysfonctionnement de la voie de signalisation médiée par l'insuline en diminuant la phosphorylation de l'IRS (Insulin Receptor Substrate I). Certains auteurs postulent que ce dysfonctionnement pourrait participer au mécanisme de résistance à l'insuline, observée dans des adipocytes humains et murins (Stephens *et al.*, 1997) (Thomson *et al.*, 1997).

La résistine, une hormone récemment découverte et dont le mode d'action est encore inconnu, est sécrétée par les adipocytes, est impliquée dans la résistance à l'insuline (Steppan *et al.*, 2001).

## ***1.2 L'adipogenèse***

L'adipogenèse est le processus complexe de différenciation cellulaire de pré-adipocytes en adipocytes matures. Ce programme survient tout au long de la vie afin d'assurer le renouvellement cellulaire et l'accumulation de TAG (Prins *et al.*, 1997). L'adipogenèse met en jeu l'activation de nombreuses cascades cellulaires conduisant à la modification de l'expression de nombreux gènes participant à la synthèse des acides gras, à leur  $\beta$ -oxydation et leur transport, ainsi qu'à ceux impliqués dans le métabolisme du glucose (MacDougald *et al.*, 1995).

### ***1.2.1 Caractérisation morphologique de la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes blancs***

Les adipoblastes dérivent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes (mésodermiques), au même titre que les chondroblastes et les myoblastes. Les adipoblastes, aux caractéristiques fibroblastiques, se différencient en pré-adipocytes par un programme encore inconnu et sont finalement convertis en adipocytes lors d'une stimulation adéquate. L'adipocyte blanc mature *in vivo* est caractérisé par une morphologie arrondie due à l'accumulation de TAG dans une vésicule unique (figure 1.6) (Ntambi *et al.*, 2000). Cette

différenciation de pré-adipocytes en adipocytes commence lors du développement embryonnaire tardif et précocement après la naissance.

La surface cellulaire, aussi bien des pré-adipocytes que des adipocytes différenciés, est caractérisée par une quantité importante de cavéoles. Les cavéoles sont des microdomaines lipidiques, formés essentiellement de sphingolipides et de cholestérol, arrangés sous la forme d'invaginations flasques de 60 à 80 nm de diamètre et caractérisés par des cavéolines. Ces dernières représentent des « scaffold-like proteins » qui forme des homo- ou hétérooligomères spécifiques des cavéoles (Okamoto *et al.*, 1998) (Scherer *et al.*, 1997). Ces structures dynamiques et en interaction avec les éléments du cytosquelette tel que l'actine, sont des éléments impliqués dans les fonctions métaboliques adipocytaires en réponse à l'insuline tels que l'incorporation de glucose (Mastick *et al.*, 1997) (Nystrom *et al.*, 1999).

Etant donné qu'il est très difficile d'isoler des pré-adipocytes d'autres cellules « fibroblasts-like », que de grandes quantités de tissus adipeux précoces sont nécessaires à la faible abondance de pré-adipocytes dans le tissu et que leur temps de demi-vie en culture est limité, la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes a été étudiée dans de nombreux modèles cellulaires *in vitro* sur des lignées cellulaires unipotentes 3T3-L1, Ob 1771, F422A... (MacDougald *et al.*, 1995)

### *1.2.2 Caractérisation moléculaire de la différenciation de pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes blancs en culture*

L'initiation et le maintien de l'état différencié sont gérés par l'expression ou la répression de gènes spécifiques contrôlée par un ensemble de facteurs de transcription. Cette activation transcriptionnelle induite résulte de l'interconnection et de l'intégration de nombreuses voies de transduction médiées par des régulateurs hormonaux et paracrines.

#### 1.2.2.1 Succession des évènements du programme de différenciation de la lignée cellulaire 3T3-L1

La succession des évènements principaux du programme de différenciation est illustrée à la figure 1.7.

La différenciation de la lignée cellulaire 3T3-L1 commence par un arrêt de la prolifération cellulaire en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, lorsque les cellules arrivent à confluence. Les pré-adipocytes maintiennent leur état non différencié par une communication paracrine, en

exprimant Pref-1 (Preadipocyte factor-1) qui est une protéine de 385 aa transmembranaire de la membrane plasmique, contenant six motifs répétés homologues à l'EGF (Epidermal Growth Factor). Cette protéine est absente dans les adipocytes matures et est complètement réprimée lors de la différenciation *in vitro* de 3T3-L1. L'activation de cette protéine passe par un clivage protéolytique qui génère un domaine extracellulaire soluble de 50 kDa biologiquement actif et possédant une activité anti-adipogénique sur les cellules voisines (Smas *et al.*, 1999). Ce motif « EGF-like » est impliqué dans l'interaction protéine-protéine de partenaires participant à la prolifération et la différenciation cellulaires. Smas *et al.* (1999) suggèrent que dans le contrôle du phénotype pré-adipocytaire, la forme transmembranaire et soluble de Pref-1 implique l'interaction entre ces domaines EGF-like et le domaine EGF-like présent à la surface cellulaire et/ou les molécules de la matrice extracellulaire (Smas *et al.*, 1999). La présence de Pref-1 inhibe l'expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , deux facteurs de transcription essentiels dans l'activation de l'adipogenèse et l'expression de gènes spécifiques des adipocytes (voir ci-dessous au point I.2.2.3). Ce stade précoce est également caractérisé par l'expression de la LPL (Lipoprotein Lipase) qui hydrolyse la molécule de TAG en glycérol et en acide gras libre au niveau des cellules endothéliales et de la FAS (Fatty Acid Synthase) qui participe à la synthèse *de novo* des TAG (MacDougald *et al.*, 1995).

C'est en réponse à un cocktail inducteur de la différenciation composé d'insuline, de glucocorticoïdes et d'agents augmentant la concentration intracellulaire en AMPc (adénosine monophosphate cyclique) en présence de sérum, que les cellules entament une phase d'expansion clonale (MacDougald *et al.*, 1995). Cette phase de divisions cellulaires (1 ou 2 cycle(s)) se produit suite à l'activation de la calpaïne, une protéase activée par le calcium qui dégrade p27, un inhibiteur de la CDK4 kinase dépendante de la cycline D. Le complexe D-CDK4 phosphoryle le pRB (Rétinoblastoma protein), libérant ainsi le facteur de transcription E2F qui peut activer la transcription des gènes nécessaires à la progression de la phase S et de la réplication de l'ADN (figure 1.8) (Patel *et al.*, 2000).

Cette étape de reprise du cycle cellulaire implique également l'expression de gènes très précoces tels que c-myc, c-fos, c-jun (MacDougald *et al.*, 1995), et l'activation de facteurs de transcription tels que C/EBP $\beta$  (Cornelius *et al.*, 1994), CREB (Reusch *et al.*, 2000) et ADD1/SREBP1 (Kim *et al.*, 1996) menant ainsi les cellules en phase G1. Parallèlement à l'expression de ces différents facteurs de transcription, on observe une inhibition d'expression de Pref-1 et une activation transcriptionnelle de gènes caractéristiques du phénotype adipocytaire tels que C/EBP $\alpha$ . Une fois synthétisées, ces molécules



stimulent l'expression des régulateurs transcriptionnels clés de l'adipogenèse tels que C/EBP $\alpha$  (antimitotique) et PPAR $\alpha$ . Ces deux facteurs sont nécessaires d'une part à l'initiation et la stabilisation du phénotype adipocytaire et d'autre part aux fonctions métaboliques associées comme la lipogenèse ou la synthèse hormonale.

### I.2.2.2 Les inducteurs de l'adipogenèse dans le type cellulaire 3T3-L1

#### *I.2.2.2.a L'insuline et l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1)*

Il a été décrit que le nombre de récepteurs à l'IGF présent à la surface des pré-adipocytes est de loin supérieur à celui de l'insuline (Lane *et al.*, 1979). Cette hormone agirait donc principalement via le récepteur à l'IGF-1 (Smith *et al.*, 1988). Suite à sa liaison sur le récepteur de type tyrosine kinase, l'insuline active la PI3-kinase (phosphatidyl inositol-3-phosphate-kinase) et la protéine kinase B (PKB ou Akt), menant ainsi à la phosphorylation du facteur CREB (cAMP-Response Element Binding protein)(Klemm *et al.*, 2001).

#### *I.2.2.2.b Les glucocorticoïdes*

Les recherches actuelles montrent que les glucocorticoïdes sont des hormones qui induisent la résistance à l'insuline tant en clinique, dans des modèles animaliers et *in vitro*, que sur des cellules en culture. Le traitement d'animaux ou l'incubation de cellules en présence de glucocorticoïdes, diminue l'incorporation de glucose induite par l'insuline, l'IGF-1 et l'hypoxie par une diminution du recrutement de GLUT4 dans la membrane des 3T3-L1. Cette diminution passe par une répression de l'expression de l'IRS-1 et affecte donc la voie de la PI3-kinase ; mais pourrait également diminuer l'expression d'une protéine motrice (encore hypothétique) associée aux vésicules de GLUT4 et impliquée dans sa translocation dans la membrane plasmique (Sakoda *et al.*, 2000). Un agoniste synthétique habituellement utilisé pour activer le récepteur aux glucocorticoïdes est la dexaméthasone. Cependant, cette molécule inhibe l'expression de Pref-1, ce qui permet l'induction du facteur C/EBP $\alpha$ , facteur de transcription précoce du programme de différenciation des 3T3-L1 (Smas *et al.*, 1999).

#### *I.2.2.2.c Les agents augmentant la concentration en AMPc*

La voie classique de production d'AMPc commence par la stimulation de l'adénylate cyclase, après la liaison de différentes hormones (dont le glucagon) à leur récepteur. Activée,

l'adénylate cyclase catalyse alors la transformation de l'ATP en AMPc qui peut alors activer de manière allostérique de nombreuses protéines dont notamment la PKA (Protéine Kinase A).. Dans le processus d'adipogenèse, cette kinase phosphoryle le facteur de transcription CREB, une fois que ses sous-unités catalytiques sont libérées des sous-unités régulatrices (Karp, 1998). Le rôle de CREB dans ce processus sera expliqué ultérieurement.

Les agents inducteurs de la différenciation fréquemment utilisés sont des activateurs mimétiques de cette voie. En effet, le db-AMPc (dibutyryl-AMPc) augmente le contenu intracellulaire en AMPc, l'IBMX (1-méthyl-3-isobutylxanthine) inhibe une phosphodiesterase, et la forskoline active l'adénylate cyclase de manière allostérique. Toutes ces molécules ont pour but d'augmenter le contenu intracellulaire en AMPc.

L'induction de la différenciation adipocytaire par le MIX 3 contenant les molécules citées ci-dessus est régulée par divers facteurs de transcription tels ADD1/SREBP1, les C/EBPs, CREB et les PPARs.

### I.2.2.3 Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1

#### *I.2.2.3.a CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs)*

Les C/EBPs appartiennent à la famille des facteurs de transcription bZip (basic domain-leucine zipper). Une fois associé à son ligand, ce récepteur nucléaire subit un changement conformationnel le dissociant de son répresseur, permettant son homo ou hétérodimérisation. Le complexe se lie à la séquence consensus (5'-ATTGCGCAAT-3') situé dans le promoteur de gènes cibles, modifiant ainsi leur expression. Alors que les isoformes précoces C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sont exprimés pendant la phase d'expansion clonale et disparaissent quand les cellules se trouvent en phase G1, l'expression de C/EBP $\alpha$  est induite lors de l'étape terminale du programme. Des études ont montré que C/EBP $\alpha$  régule l'expression de C/EBP $\beta$  au niveau transcriptionnel (Tang *et al.*, 1999). Néanmoins, cette activation est bloquée par la présence d'autres membres de cette famille tels que CUP (C/EBP $\alpha$  Undifferentiated Protein) et CHOP (C/EBP $\alpha$  Homology Protein). Le répresseur CUP agit de manière compétitive pour le site de liaison C/EBP $\alpha$  (Vasseur-Cognet *et al.*, 1993) alors que CHOP-10/Gadd 153 agissant comme un dominant négatif, empêche la liaison des dimères C/EBP $\alpha$  à sa séquence consensus (Ubeda *et al.*, 1996). Caractérisé par une action antimitotique qui termine la phase d'expansion clonale, C/EBP $\alpha$  interagit directement avec des protéines impliquées dans le

contrôle du cycle cellulaire (Ubeda *et al.*, 1996). Les mécanismes par lesquels C/EBP $\beta$  inhibe le cycle cellulaire est actuellement débattu mais il a été démontré que C/EBP $\beta$  stabilise la protéine p21 par interaction physique avec elle, augmentant ainsi le temps de demi-vie de cette protéine (Timchenko *et al.*, 1997). De plus, C/EBP $\beta$  s'associe avec les kinases dépendantes des cyclines 2 (CDK2) et 4 (CDK4), inhibe ainsi leur activité et accélère leur dégradation dépendant du protéasome 26S (Wang *et al.*, 2001)

#### *I.2.2.3.b Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor1/ Sterol Regulatory Element Binding Protein (ADD1/SREBP1)*

ADD1/SREBP1 fait partie de la famille des facteurs de transcription b-HLH-lz (basic Helix-loop-Helix leucine zipper). Ils existent sous 2 isoformes dont SREBP1-a, SREBP1-c et SREBP2. Les deux premières isoformes dérivent d'un même gène, qui diffèrent par le site d'initiation de leur transcription (Brown *et al.*, 1997). Kim *et al.* (1998) ont montré que ADD1/SREBP1 n'était pas suffisant pour induire la conversion de pré-adipocytes en adipocytes mais qu'il activait l'expression de deux gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras : la FAS, qui participe à la lipogenèse (*de novo*) de TAG à partir du glucose et la LPL, qui hydrolyse la molécule de TAG en glycérol et en acide gras libre à la surface des cellules endothéliales (Kim *et al.*, 1998). Ces isoformes activent l'expression de gènes nécessaires à la glycolyse et à la biosynthèse des acides gras et des TAG dont l'ATP citrate-lyase qui constitue la première étape de la lipogenèse *de novo*, l'ACC (Acétyl-CoA Carboxylase) qui catalyse la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA, la FAS, la GPDH (Glycerol-3-Phosphate Deshydrogenase), la SCD1 (Stearyl-CoA Desaturase) et le GPAT (Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase) qui catalyse la première étape de la synthèse des glycérolipides.

SREBP2 dérive, quant à lui, d'un gène différent et est un activateur de la synthèse des acides gras, des TAG et du cholestérol (Shimano *et al.*, 1997).

Ces SREBPs sont synthétisés sous la forme de précurseurs inactifs associés au feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux lors d'une déplétion cellulaire en cholestérol. L'activation de ces facteurs de transcription commence par la formation d'un complexe avec la protéine SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) qui escorte les SREBPs au complexe de Golgi où ils sont séquentiellement clivés par 2 protéases, S1P (Site-1 Protease) et S2P (Site-2 Protease) (Sakai *et al.*, 1998). Le domaine amino-terminal libéré migre dans le noyau et active ainsi l'expression des gènes cibles (figure 1.9). Les acides gras

néosynthétisés servent également de ligands endogènes pour PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) dans le programme adipocytaire (Kim *et al.*, 1998).

#### *1.2.2.3.c Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)*

Cette famille de récepteurs nucléaires comprend 3 isoformes PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (également connu sous PPAR $\delta$  ou FAAR pour Fatty Acid-Activated Receptor) et PPAR $\gamma$ . Ce dernier peut se trouver sous 3 isotypes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ ), résultant d'une variation dans le site d'initiation de la transcription. Alors que PPAR $\alpha$  est ubiquiste, PPAR $\beta$  est principalement exprimé au niveau du foie et de la graisse brune et PPAR $\gamma$  est quant à lui, particulièrement abondant dans les adipocytes blancs, avec une prédominance de l'isoforme PPAR $\beta$ . Plusieurs ligands naturels activant PPAR $\gamma$  ont été identifiés à ce jour, dont les acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique, linolénique, l'acide arachidonique ainsi que ses dérivés comme le 15d-PGJ2 (15-déoxy-delta 12,14 prostaglandin J2) (Xu *et al.*, 1999) (Kliewer *et al.*, 1995). Il existe également des agonistes synthétiques de PPAR $\gamma$  dont les plus connus sont les TZDs (thiazolidinediones) qui sont utilisés à des fins thérapeutiques (Lehmann *et al.*, 1995).

Après sa liaison avec un de ses ligands, PPAR $\gamma$  forme un complexe hétérodimérique avec RXR $\gamma$  (Retinoic Acid Receptor) capable de se lier à une séquence d'ADN consensus PPRE (Peroxisome Proliferator-Responsive Element). Cette séquence consensus 5'-A(A/T)(C/G)T AGGTCA A AGGTCA-3' est formée d'une répétition directe séparée par une seule base. L'activation de ce facteur PPAR $\gamma$  permet la transcription de gènes impliqués dans divers processus physiologiques et physiopathologiques (figure 1.10) (Tontonoz *et al.*, 1994). Takahashi *et al.* (2002) rapportent que l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  nécessite son interaction avec différents co-activateurs tels que CBP (CREB Binding Protein) et P300 et qu'à leur tour, ceux-ci augmenteraient l'activité de PPAR $\gamma$  (Takahashi *et al.*, 2002). Comme il a été décrit, C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  stimulent l'expression de C/EBP $\alpha$  et de PPAR $\gamma$ . Frohnert *et al.* (1999) ont montré que ces deux facteurs de transcription induisent leurs expressions mutuelles sous le contrôle de CBP et P300, et cette synergie favoriserait l'adipogenèse, par l'activation transcriptionnelle de gènes adipogéniques tels que la PEPCK (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase), qui est impliquée dans la glycolyse, ALBP/aP2 (Adipocyte Lipid-Binding Protein) qui est un transporteur aux acides gras et GLUT4 (Glucose Transporter 4), qui est un transporteur au glucose (Frohnert *et al.*, 1999). Une liste de gènes

possédant un site PPRE au niveau de leur région promotrice est présentée à la figure 1.11 (pour revue récente : (Houseknecht *et al.*, 2002)).

#### *1.2.2.3.d CAMP-Response Element Binding Protein (CREB)*

Cette famille de protéines comprenant CREB, CREM (CRE-modulator) et l'ATF (1/2) (Activating Transcription Factors 1/2) est, comme son nom l'indique, une famille de facteurs de transcription dont l'activation est médiée par la concentration intracellulaire en AMPc qui joue un rôle crucial dans l'adipogenèse. CREB est constitutivement exprimé et lié à la séquence consensus CRE (5'-TGACGTCA-3'). Son activation consiste en une phosphorylation sur la sérine 133 qui permet son homo- ou hétérodimérisation et le recrutement de la machinerie basale de transcription via l'interaction avec CBP et p300 (Ericsson *et al.*, 1998) (Takahashi *et al.*, 2002). Comme il a déjà été mentionné, le facteur de transcription CREB est principalement activé par la voie de la PKA. Néanmoins, celui-ci s'est avéré être l'effecteur de nombreuses voies de signalisation dont celle des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) par ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases 1/2) ou p38, et de la PI3-kinase (figure 1.12) (Lee *et al.*, 2001) (Klemm *et al.*, 2001). C'est suite au traitement par l'insuline et au db-AMPc que CREB active la transcription de gènes adipogéniques tels que la PEPCK, la FAS, la ALBP/aP2 et la CPT (Carnitine Palmitoyl Transférase), qui est impliquée dans l'acheminement des acides gras à travers la mitochondriale à des fins de  $\beta$ -oxydation (Brady *et al.*, 1992) (Lee *et al.*, 2001) (Klemm *et al.*, 2001).

Reusch *et al.* (2000) démontrent par l'utilisation d'un dominant négatif (K-CREB) ou d'une forme constitutivement active de la protéine (VP16-CREB), que CREB est à la fois nécessaire et suffisant pour induire la différenciation adipocytaire (Reusch *et al.*, 2000). Cependant, l'implication d'un autre membre de cette famille dans l'adipogenèse est actuellement débattue. En effet, l'activation d'ATF2 par la p38 MAPK précéderait l'expression de PPAR $\alpha$  dans les 3T3-L1 (Lee *et al.*, 2001).

### ***1.3 Le métabolisme du glucose***

#### ***1.3.1 Biosynthèse et sécrétion de l'insuline***

L'insuline est produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie et exerce une action hypoglycémiante. Elle appartient à un groupe de peptides incluant l'IGF-1.

L'insuline est synthétisée sous la forme d'une chaîne polypeptidique unique, la pré-pro-insuline. Cette molécule subit un changement de conformation par la formation de ponts disulfures structurant ainsi la pro-insuline. C'est au niveau des vésicules de sécrétion que cette pro-insuline est clivée en deux sites par l'action des endoprotéases PC2 et PC3, libérant ainsi l'insuline et le propeptide C (C pour connecting car il relie les 2 chaînes A et B) (figure 1.13) (Lodish, 1997).

Cette hormone montre un profil temporel pulsatile en réponse à certains acides aminés, aux acides gras mais principalement au glucose sanguin postprandial. Celui-ci pénètre dans les cellules  $\beta$  pancréatiques via l'isoforme 2 des transporteurs de glucose (GLUT2) où il est immédiatement phosphorylé en G6-P (glucose-6-phosphate) par la glucokinase. Cette dernière réaction s'accompagne de la production d'adénosine diphosphate (ADP) qui, après transport dans la matrice mitochondriale, stimule la formation d'adénosine triphosphate (ATP). Cette accumulation d'ATP entraîne la fermeture des canaux  $K^+$  (ATP-dépendants) dans la membrane plasmique, menant à une dépolarisation qui conduit à l'ouverture de canaux calcium voltage-dépendants. Cet influx massif d'ions calcium provoque la fusion des granules de sécrétion contenant l'insuline avec la membrane plasmique et donc sa libération dans la circulation sanguine (figure 1.14) (Bell *et al.*, 2001).

Cette sécrétion peut être modulée par une variété de facteurs neuroendocriniens et hormonaux tels que le GIP (Gastrointestinal Peptide) (Yip *et al.*, 2000).

#### ***1.3.2 Actions tissu spécifique de l'insuline***

L'insuline conduit principalement à la mise en réserve à la fois du glucose sous forme de glycogène dans les hépatocytes, mais également sous forme de TAG dans les adipocytes. Dans les cellules qui répondent à l'insuline tels que le muscle strié squelettique et les adipocytes, son action sur le métabolisme du glucose est de stimuler l'incorporation de glucose ainsi que les synthèses associées. Elle inhibe également la production et la libération

de glucose hépatique en bloquant la gluconéogenèse et la glycolyse (Michael *et al.*, 2000) (Bergman *et al.*, 2000). L'action hypoglycémisante de l'insuline résulte donc de deux effets qui sont la conséquence de changements transcriptionnels contrôlant la synthèse d'enzymes régulatrices. En effet, elle favorise la gluconéogenèse hépatique en activant la synthèse des enzymes glukokinase et GS (Glycogen Synthase) et elle augmente l'incorporation de glucose dans les tissus périphériques qui le métabolisent par la translocation du transporteur de glucose sensible à l'insuline (GLUT4), préalablement stocké dans des vésicules intracellulaires GSVs (Glucose Storage Vesicles), dans la membrane plasmique de la cellule.

### *1.3.3 Les transporteurs de glucose*

Le glucose traverse la membrane plasmique par diffusion facilitée selon un gradient de concentration entre le milieu extra- et intracellulaire. Ce transport est assuré par des protéines spécialisées, les transporteurs au glucose (GLUTs). On dénombre actuellement onze isoformes de ce type de transporteur, qui sont spécifiquement exprimés dans différents tissus (figure 1.15) (Joost *et al.*, 2001). Ces protéines sont caractérisées par une homologie de structure (Joost *et al.*, 2001). En effet, ces transporteurs possèdent douze hélices  $\alpha$  transmembranaires et forment des canaux dans la membrane plasmique.

Contrairement à GLUT4, les autres isoformes GLUTs sont constitutivement exprimées en surface cellulaire. L'insuline active différentes cascades de transduction du signal menant à l'exocytose de GLUT4. Après stimulation et sa translocation transitoire, GLUT4 est internalisé par voie endosomale et reprend sa localisation intracellulaire périnucléaire (Guilherme *et al.*, 2000).

### *1.3.4 Voies de signalisation médiées par l'insuline*

L'insuline active de nombreuses cascades de transduction. L'initiation de ce mécanisme d'activation commence par la liaison de l'insuline à la sous-unité  $\beta$  de son récepteur (IR pour Insulin Receptor) et de l'IGFR (IGF Receptor) et la transphosphorylation du domaine cytoplasmique des sous-unités  $\beta$ . La liaison de l'insuline augmente de l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur. Contrairement à d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase qui recrutent directement divers effecteurs, l'IR phosphoryle une famille de

protéines dont les plus connues sont les IRS (Insulin Receptor Substrate), qui sont donc des "docking proteins". Les éléments recrutés, et associés aux IRS phosphorylés sur des résidus tyrosine, participent alors aux différentes voies de signalisation.

#### I.3.4.1 La voie de la PI3-kinase

La PI3-kinase est constituée d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85) qui interagit avec les résidus tyrosines phosphorylés de l'IRS via son domaine SH2 (Myers *et al.*, 1992). La PI3-kinase catalyse notamment la formation de PIP3 (Phosphatidyl Inositol 3, 4, 5-triphosphate) conduisant ainsi à la translocation de la PKB (Akt) vers le feuillet interne de la membrane plasmique. Suite à la liaison d'Akt aux PIP3, la protéine sérine/thréonine kinase modifie sa conformation pour permettre sa phosphorylation par les PDKs (Phosphoinositide-Dependent Kinases) sur la thréonine 308 et sur la sérine 473. Les PDKs phosphorylent également les protéines kinases C (PKC  $\alpha/\beta$ ). Akt et PKC  $\alpha/\beta$  interagissent directement avec les GSVs et phosphorylent GLUT4 assurant sa translocation en membrane plasmique (figure 1.16). PKB/Akt active ensuite différents éléments dont les SREBPs et la protéine GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ) qui, en conditions basales, régule de manière négative l'activité de certaines protéines impliquées dans l'incorporation et le métabolisme du glucose (Orena *et al.*, 2000). Initialement découverte pour jouer un rôle régulateur de la néoglycogenèse, la protéine GSK3 $\beta$  contrôle également d'autres processus cellulaires tels que la prolifération, le transport du glucose et la lipogenèse (Bevan, 2001) (Grimes *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel la GSK3 $\beta$  régule le transport du glucose et la synthèse du glycogène hépatiques, se passe par un processus de phosphorylation/déphosphorylation (figure 1.17). Constitutivement active, la kinase inhibe la GS ainsi que l'IRS par la phosphorylation d'un résidu sérine. Suite à une stimulation par l'insuline, la GSK3 $\beta$  est inhibée par la voie de la PI3-kinase. Cette voie permet l'activation des protéines Akt et PKC  $\alpha/\beta$  qui stimulent l'incorporation du glucose et l'activation de la PPI (Protéine Phosphatase I) qui déphosphoryle la GS, permettant ainsi la synthèse du glycogène (Cohen, 1999).

Non seulement l'hormone hypoglycémiante stimule la translocation de GLUT4 en membrane plasmique, mais elle empêche également son internalisation par l'inhibition d'une petite protéine GTPase, Rab 5 qui interagit avec la protéine motrice dynéine (Huang *et al.*, 2001).



Les adipocytes complètement différenciés expriment de manière importante les microfilaments d'actine et des études récentes montrent que l'insuline provoque une réorganisation dynamique de cette actine corticale par la protéine TC10. Ce remodelage permet la translocation de GLUT 4 en membrane plasmique (Kanzaki *et al.*, 2001).

La fusion des GSVs avec la membrane plasmique et ainsi l'exposition de GLUT4 est médiée par l'interaction des protéines v-SNARE (vesicle associated soluble N-methylmaleimide-sensitive factor attached protein receptors) et VAMP-2 (vesicle associated membrane protein 2) avec les protéines t-SNARE (target-SNARE) et la synthaxine 4 (Millar *et al.*, 1999). Le calcium joue également un rôle important dans ce processus (Whitehead *et al.*, 2001). Mentionnons encore que l'incorporation de glucose est accrue lors de stress oxydatifs par stimulation de la translocation de GLUT 4 et ce, en l'absence d'insuline (Tirosh *et al.*, 2001) (Rudich *et al.*, 1998).

### I.3.4.2 La voie des Cbl/CAP

Une voie alternative également médiée par l'insuline et menant également à l'exocytose du transporteur GLUT4 consiste en la phosphorylation de la protéine oncogène Cbl sur un résidu tyrosine. Cbl est lié à l'adaptateur CAP (Cbl-associated Adaptator Protein) et une fois phosphorylé, ce complexe migre vers la membrane plasmique où il se fixe à la protéine fotilline retenue dans des microdomaines lipidiques (lipids rafts) enrichis en cavéolines (figure 1.16). Cette association recrute l'adaptateur protéique Crk II qui à son tour, interagit avec la C3G (guanyl nucleotide-exchange protein) possédant une activité GTPase qui permet l'activation de la protéine G, TC10. Cette dernière joue un rôle important dans le remodelage des filaments d'actine, permettant ainsi la translocation de GLUT 4 en membrane plasmique. (Ros-Baro *et al.*, 2001).

Ces deux voies de signalisation activées par l'insuline mènent donc à l'incorporation de glucose dans les adipocytes matures (Ribon *et al.*, 1998) (pour revue récente : (Saltiel *et al.*, 2001)).

### I.3.4.3 La voie des MAP kinases

Cette voie des MAP kinases est activée par des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'IR et l'IGFR qui phosphorylent l'IRS. Ce dernier recrute alors le complexe Grb2-SOS. Ce complexe possède activité GTPase migre ensuite vers la membrane plasmique, où il active

la protéine oncogène farnésylée p<sup>21</sup>Ras qui déclenche alors la cascade de phosphorylation des MAP kinase (Mitogen-Activated Protein kinase) jusqu'aux effecteurs Fos (Watson *et al.*, 2001) et Elk qui modulent l'expression des gènes cibles. Pour revues récentes (Saltiel *et al.*, 2001) (Watson *et al.*, 2001)

### *1.3.5 Métabolisme du glucose et importance de la mitochondrie*

Une fois dans le cytoplasme, le glucose est immédiatement phosphorylé en G6-P par la glucokinase qui peut être partiellement oxydé par la glycolyse. De plus, c'est au niveau du G6-P que sont greffées diverses voies métaboliques activées selon la spécificité tissulaire et la demande énergétique associée (figure 1. 18).

Parce que la glycogénèse et la synthèse de cholestérol sont essentiellement assurées par les hépatocytes et non les adipocytes, ces voies ne seront pas développées dans ce travail.

Le glucose est essentiellement connu pour être oxydé dans la voie de la glycolyse. Cependant, il peut également contribuer à la lipogénèse et plus particulièrement à la formation de TAG lors d'un excès d'acétyl-CoA (acétyl-Coenzyme A) et de G3-P (glycérol 3-phosphate) (Ruan *et al.*, 2001).

#### 1.3.5.1 Rôle de la mitochondrie dans le métabolisme du glucose

Les mitochondries sont des organites dont une des fonctions principales est d'assurer la phosphorylation de l'ADP en ATP, à partir de l'énergie libérée lors de l'oxydation complète des substrats.

Le pyruvate produit par la glycolyse pénètre dans la matrice mitochondriale via la PDH (Pyruvate Deshydrogénase) qui le transforme en acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA est le précurseur de la synthèse des acides gras, du cholestérol et alimente le cycle de Krebs, qui oxyde l'acétate pour produire des cofacteurs réduits. La glycolyse et le cycle de Krebs participent donc à l'oxydation complète du glucose afin de générer des cofacteurs réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) qui alimentent la chaîne de transport des électrons.

##### *1.3.5.1.a La chaîne de transporteurs d'électrons*

Cette chaîne consiste en une succession de quatre complexes enzymatiques insérés dans la membrane mitochondriale interne (MMI), qui assurent les réactions d'oxydo-réduction

permettant le transfert d'un donneur à un accepteur d'électrons. Ces électrons sont transmis depuis le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit) ayant le plus faible potentiel d'oxydo-réduction standard ( $E_0' = -0,32$  volts) vers le complexe ayant le potentiel d'oxydo-réduction standard le plus élevé ( $E_0' = 0,25$  volts) pour enfin être cédés à l'oxygène ( $E_0' = 0,82$  volts). La structure de ces complexes est reprise à la figure 1.19 et leur organisation au niveau de la MMI est représentée à la figure 1.20. Mentionnons également que les génomes nucléaire et mitochondrial contribuent à l'expression des complexes I, III et IV.

On peut inhiber la chaîne respiratoire en présence d'inhibiteurs métaboliques qui ciblent les différents complexes.

Le complexe I peut être inhibé par des molécules qui entrent en compétition avec l'ubiquinone pour le site de liaison. Parmi ces molécules, citons l'amytal et la roténone.

Le complexe II peut également être inhibé par des molécules qui empêchent la fixation de l'ubiquinone comme le malonate.

Le complexe III peut, quant à lui, être inhibé par la stigmatelline qui bloque l'oxydation de l'ubiquinol issu du complexe I ou II, ou par l'antimycine qui, par sa liaison au cytochrome b, empêche son oxydation (Raha *et al.*, 2000).

Les inhibiteurs du complexe IV, tels que le cyanure ( $\text{CN}^-$ ) ou le monoxyde de carbone ( $\text{CO}$ ) agissent au niveau du cytochrome  $a_3$ , en se liant à la paire d'électrons libres et empêchent donc la fixation de l' $\text{O}_2$ .

#### *1.3.5.1.b Force protomotrice et la Fo-F1 ATP Synthase*

Ce transfert d'électrons à l'oxygène des complexes I, III et IV s'accompagne d'une extrusion de protons à travers la MMI depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, conduisant ainsi à l'installation d'un gradient électrochimique ( $\Delta\psi = \pm 220$  mV). L'énergie libre contenue dans cette force protomotrice est ensuite convertie en énergie chimique sous forme d'ATP par un complexe transmembranaire multimérique, la Fo-F1 ATP Synthase (figure 1.20). Le mécanisme de la Fo-F1 ATP Synthase implique des changements conformationnels menant à une variation d'affinité envers le substrat. Alors que la translocation de protons est assurée par le domaine Fo du rotor, le domaine  $F_1$  catalyse la formation de la liaison pyrophosphate de l'ATP à partir de l'ADP matriciel. Une fois synthétisées, ces molécules d'ATP ( $\text{ATP}^{4-}$ ) rejoignent le cytoplasme par l'ANT (Adénine Nucléotide Translocase). Ce transporteur assure donc l'équilibre entre la production et la consommation d'énergie par l'échange d'un  $\text{ATP}^{4-}$  contre un  $\text{ADP}^{3-}$ .

### *1.3.5.1.c Les agents découplants*

Les phosphorylations oxydatives peuvent être perturbées par des molécules qui perméabilisent la MMI aux protons. Parmi ces molécules, citons le FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoro-methoxy-phenylhydrazone). Ce passage de protons s'accompagne d'une diminution du potentiel de membrane et d'une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.

Il existe également des protéines qui exercent une activité découplante au niveau de la mitochondrie: les UCPs. Ces protéines permettent le retour des protons accumulés dans l'espace intermembranaire vers la matrice et la libération de l'énergie contenue dans le potentiel électrochimique sous forme de chaleur (Klingenberg *et al.*, 1985). Trois isoformes existent : UCP-1, qui est spécifique du tissu adipeux brun, UCP-2 qui est ubiquiste et UCP-3, exprimée principalement dans le muscle squelettique.

Ces protéines découplantes sont particulièrement intéressantes dans le contexte de la recherche sur l'obésité, étant donné qu'un découplage accru s'oppose au stockage de l'énergie sous forme de lipides. Des études ont en effet déjà montré que des souris transgéniques surexprimant l'UCP-3 humaine dans le muscle squelettique ne grossissent pas en dépit de leur hyperphagie (Clapham *et al.*, 2000). Cependant, il est connu que l'isoforme UCP-2 est surexprimée dans les hépatocytes d'individus obèses (Chavin *et al.*, 1999). De plus, nous avons montré au laboratoire que l'UCP-2 est également surexprimée dans les adipocytes en différenciation terminale (S. Vankokningsloo, communication personnelle).

Ces constatations semblent contradictoires, mais il faut tenir compte du fait que l'activité de l'UCP-2 est régulable, notamment par les rétinoïdes et les acides gras, qui augmentent le transport des protons par ces protéines (Rial *et al.*, 1999) (Bouillaud *et al.*, 1994), ainsi que par la GDP, qui l'inhibe (Bouillaud *et al.*, 1994). La surexpression d'UCP-2 ne s'accompagne donc pas nécessairement d'une augmentation du découplage. De plus, l'activité "découplante" d'UCP-2 a été déduite sur base d'une forte homologie de séquence avec l'isoforme UCP-1, dont le rôle dans la thermogenèse est bien connu (Nedergaard *et al.*, 2001). Il est donc possible que l'UCP-2 joue d'autres rôles, encore à découvrir.

A côté de son rôle comme substrat énergétique, le glucose est appelé à jouer d'autres rôles dans la cellule. Dans le chapitre suivant, nous allons maintenant discuter de l'importance du glucose en tant que régulateur de l'expression de gènes.

### *1.3.6 Les facteurs de transcription activés par le glucose*

L'homéostasie énergétique cellulaire est entre autres maintenue par la régulation d'une variété d'enzymes au niveau transcriptionnel. En présence d'insuline et d'une concentration élevée en glucose, on observe une augmentation de l'expression de nombreux gènes tels que la L-PK, l'ACC et la FAS, intervenant dans la glycolyse et la lipogenèse (Woods *et al.*, 2000) (Ruan *et al.*, 2001). L'expression de ces gènes semble régulée par des facteurs de transcription sensible au glucose.

Récemment identifié et encore peu connu, le ChREBP (Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein) est un membre des b-HLH-lz (basic domain-helix-loop-helix-leucine zipper), structuré en différents domaines fonctionnels dont un NLS (Nuclear Localisation Sequence) riche en proline permettant probablement son interaction avec d'autres protéines. ChREBP contient également trois sites cibles de phosphorylation par la PKA que sont la sérine 196 (P1) voisine du domaine NLS, la sérine 626 (P2) voisine de la séquence b-HLH et enfin la thréonine 666 (P3) située dans domaine b-HLH. ChREBP est régulé au niveau de P1 et de P3 par des mécanismes de phospho- et déphosphorylation, respectivement contrôlés par l'AMPc et le glucose ; alors que P2 semblerait ne jouer qu'un rôle passif dans l'activité transcriptionnelle de la protéine (Kawaguchi *et al.*, 2001). Ce facteur de transcription connu pour être exprimé dans le cytosol est maintenu sous sa forme inactive par la phosphorylation du site P3. Le processus d'activation de ChREBP par le glucose se déroule en deux étapes de déphosphorylation catalysées par la phosphatase PP2A qui agit dans un premier temps sur le site P3, provoquant ainsi l'importation de la protéine dans le noyau. La seconde déphosphorylation, se produisant quant à elle au site P1, permet la liaison du facteur de transcription à la séquence E-box (5'-CACGTG-3') contenue notamment dans le promoteur de la L-PK (figure 1.21) (Towle, 2001). ChREBP agirait de manière coordonnée avec SREBP dans le processus de lipogenèse *de novo*.

Déjà cité pour jouer un rôle dans l'adipogenèse, SREBP1 contrôle également l'expression de gènes lipogéniques tels que la L-PK, l'ACC et la FAS, en réponse à l'insuline et au glucose (Foretz *et al.*, 1999b) (Foretz *et al.*, 1999a) mais aussi le gène du récepteur aux LDL (Low Density Lipoprotein), en réponse à une déplétion intracellulaire en stérols (Streicher *et al.*, 1996). Ce facteur de transcription se lie non seulement aux sites SRE mais également aux sites palindromiques E-box (5'-CA XX TG-3') par la présence d'un résidu tyrosine au niveau de leur DBD (DNA-Binding Domain). (Latasa *et al.*, 2000). Le

recrutement de la machinerie basale de transcription est possible par l'interaction de SREBP1 avec d'autres protéines telles que Sp1, CBP et P300 (Bennett *et al.*, 1995) (Ericsson *et al.*, 1998). Bien que l'action de l'insuline et du glucose sur SREBP1 soient encore peu connus, Mourrieras *et al.* (1997) ont montré que le glucose agit par l'un de ces métabolites et donc, que l'expression des gènes cibles est induite après une période d'au moins 16 h (Mourrieras *et al.*, 1997). Ajoutons également que ce facteur de transcription n'est plus actif en présence d'acides gras, qui inhibent alors la lipogenèse *de novo* à partir du glucose (Xu *et al.*, 1999).

La liaison de ces différentes classes de facteurs de transcription aux séquences régulatrices est essentielle à l'activation génique, notamment pour celle de la FAS (Latasa *et al.*, 2000).

## ***1.4 Métabolisme des acides gras***

### *1.4.1 Les lipides : classification*

Les lipides peuvent être classés en deux catégories : les lipides simples, composés d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et les lipides complexes, qui sont des lipides simples liés à d'autres molécules telles que des sucres (glycolipides et glycérolipides), des acides aminés (sphingolipides) ou des radicaux contenant du phosphore (phospholipides).

Nous ne nous intéresserons dans la suite de cette introduction qu'aux lipides simples et plus particulièrement aux acides gras dont la classification porte sur la longueur de la chaîne hydrocarbonée et la présence ou non d'une ou de plusieurs double(s) liaison(s). On parlera alors d'acides gras à courte, moyenne ou longue chaîne qui peuvent être saturés, mono- ou polyinsaturés, en fonction de l'absence ou de la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons. Un tableau reprenant la nomenclature des acides gras ainsi que leur source alimentaire principale est présenté à la figure 1.22 .

Avant toute utilisation, les acides gras à longue chaîne (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>) sont activés par estérification d'un groupement Coenzyme A (CoA). Cette réaction nécessite de l'ATP et est catalysée par la FACS (Long chain Fatty Acyl-CoA Synthetase) qui lie le Coenzyme A sur le C<sub>1</sub> de l'acide gras par un lien thioester. Ces esters d'acyl-CoA constituent des substrats importants pour de nombreux tissus où ils sont impliqués dans différents processus cellulaires. En effet, ils participent à la synthèse de phospholipides membranaires, à l'acylation de

protéines, à la régulation de l'activation de certains facteurs de transcription et constituent des stimuli déclenchant des cascades de transduction du signal telles que le trafic vésiculaire, l'activation du récepteur à la ryanodine...(figure 1.23 ) (Abumrad *et al.*, 1998) (Duplus *et al.*, 2000).

De plus, les acides gras à longue chaîne représentent une source d'énergie importante nécessaire au fonctionnement de certains tissus tels que les tissus musculaires strié squelettique et cardiaque. En effet, en conditions physiologiques, les cardiomyocytes de rat retirent essentiellement leur énergie (60-70 %) sous forme d'ATP par la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Kudo *et al.*, 1995). Cependant, Huss *et al.* (2001) montrent que les cardiomyocytes s'adaptent aux conditions hypoxiques en favorisant la voie de la glycolyse plutôt que la  $\beta$ -oxydation, dans le but de préserver leur capacité de produire de l'énergie (Huss *et al.*, 2001).

### *1.4.2 Digestion, métabolisation et transport sanguin des lipides*

Les graisses alimentaires sont digérées au niveau du duodénum par des lipases et estérases pancréatiques qui sont activées à l'interface lipides-eau des émulsions stabilisées par les sels biliaires. Absorbés au niveau des entérocytes, les produits de la digestion des lipides sont transformés en TAG et sécrétés sous forme de chylomycrons. Ces particules sont libérées dans la lymphe pour rejoindre la circulation sanguine afin d'être acheminées vers les différents tissus. Les TAG sont partiellement hydrolysés en acides gras libres et en glycérols à la surface des cellules endothéliales des capillaires irriguant les tissus périphériques (musculaire et adipeux) par la LPL. Les acides gras libres restent dans le tissu alors que le glycérol est transporté dans le foie, où il est transformé en dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire de la glycolyse, par l'action de la glycérol kinase et de la GPDH.

La mobilisation des TAG de réserve à partir du tissu adipeux nécessite leur hydrolyse en glycérols et en acides gras libres par la HSL (Hormone Sensitive Lipase). Libérés dans la circulation sanguine, les acides gras sont transportés par l'albumine vers les différents tissus.

### *1.4.3 Transport des acides gras à travers les membranes biologiques*

L'importance structurale et métabolique des acides gras libres et de leurs dérivés nécessite un système d'incorporation efficace et régulable dans les cellules (Dutta-Roy, 2000).

Ce transport à travers la membrane plasmique peut se faire par soit diffusion passive, soit par diffusion facilitée. La diffusion passive consiste en une succession d'évènements tels que l'adsorption, un mouvement de flip-flop et la désorption de l'acide gras [Hamilton, 2001 #156] et la diffusion facilitée nécessite l'action de protéines membranaires spécifiques. Cinq transporteurs ont été identifiés à ce jour : la FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase / Clusters Differentiation 36), l'ADRP (Adipose Differentiation Related Protein), la Fatty Acid Transporter Protein (FATP), la FABP (Fatty Acid Binding Protein) et la FACS (long chain Fatty Acyl-CoA Synthetase). Ces protéines sont insérées ou associées à la membrane plasmique et possèdent une spécificité de transport selon la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Cependant, les fonctions physiologiques probablement multiples et la régulation de l'activité et de l'expression de ces transporteurs restent encore inconnues (Bonen *et al.*, 2000)

Bonen *et al.* (2000) montrent que l'incorporation des acides gras par la FAT/CD36 (88 kDa) dans le muscle strié squelettique, est un processus régulable comparable à celui de GLUT4 en réponse à l'insuline. En effet, ce mécanisme consiste en la translocation de vésicules intracellulaires contenant FAT/CD36 vers la membrane plasmique afin d'augmenter l'incorporation des acides gras en réponse à une contraction musculaire (Bonen *et al.*, 2000)

Les FABPs existent sous différentes isoformes, dont AFABP (Adipose FABP) et HFABP (Heart FABP) qui sont insérées dans la membrane plasmique et structurées en un tonneau □ flanqué de courtes hélices □ responsables de la liaison à l'acide gras. Alors que HFABP est exprimée dans de nombreux tissus et possède une meilleure affinité envers les acides gras saturés (versus polyinsaturés), AFABP est exprimée par les adipocytes et macrophages, et ne montre aucune spécificité envers le substrat à incorporer. A côté de ces FABP de 43 kDa localisées dans les membranes plasmiques, on retrouve la FABPc (FABP cytosolique) jouant un rôle cytoprotecteur. Gargiulo *et al.* (1999) rapportent que chez les mammifères, le transport des acides gras à longue chaîne à travers la membrane plasmique des adipocytes, assuré par la FATP (63 kDa) est bidirectionnel. Ce flux permet d'une part leur entrée dans la cellule afin d'y être métabolisés, et d'autre part leur exportation après la lipolyse. L'efficacité de l'incorporation des acides gras à longue chaîne dans la cellule est fonction de l'action coordonnée de la FATP et de la FACS. En effet, FACS estérifie immédiatement les acides gras incorporés avec le Coenzyme A et inhibe ainsi leur reflux (Gargiulo *et al.*, 1999). Le modèle proposé pour expliquer l'action coordonnée et synergique de la FATP et de la FACS sur l'incorporation des acides gras à longue chaîne est présenté à la figure 1.24 . Comme on peut le voir sur cette figure, ces acyls-CoA peuvent être pris en



charge par différentes protéines, telles que la FABPc et l'ACBP (Acyl-CoA-Binding Protein), qui jouent un rôle similaire à l'albumine plasmatique puisqu'elles transportent des groupements hydrophobes à travers un milieu aqueux. Certains auteurs proposent que la FABPc joue un rôle protecteur contre la cytotoxicité des acides gras. En effet, à concentration élevée, les acides gras ont tendance à former des micelles qui disruptent l'intégrité membranaire. FABPc maintiendrait une concentration intracellulaire réduite en acides gras en favorisant leur métabolisation (Zimmerman *et al.*, 2001).

L'ACBP se trouve à plus faible concentration dans le cytosol que FABPc (10-50  $\mu$ M *versus* 100-300  $\mu$ M), mais a une affinité 1000 fois plus élevée pour les esters d'acyls-CoA à longue chaîne (C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub>). De nombreuses études ont montré que l'acyl-CoA associé à l'ACBP est un substrat pour la CPT1 (pour revue récente : (Eaton, 2002)).

L'ADRP, qui est une protéine de 50 kDa, est exprimée spécifiquement dans la membrane plasmique de pré-adipocytes au début du processus de différenciation. Elle se retrouve également associée aux vésicules contenant des TAG dans l'adipocyte mature [Gao, 1999 #173]. Ces auteurs montrent par une mesure comparative d'incorporation d'acides gras à courtes et longues chaînes, que cette protéine régule uniquement l'entrée des acides gras à longue chaîne. L'ADRP augmente donc l'incorporation intracellulaire d'acides gras mais n'intervient pas dans leur accumulation dans les vésicules de TAG caractéristiques des adipocytes matures.

### *I.4.4 Métabolisme lipidique dans le tissu adipeux*

Le tissu adipeux est le site principal des processus de lipogenèse et de lipolyse. La quantité de TAG accumulés dans les adipocytes est le résultat de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des acides gras. Nous allons passer en revue les différentes étapes impliquées dans ces 2 voies métaboliques.

#### I.4.4.1 La lipogenèse et synthèse des TAG

Chez les mammifères, les lipides néosynthétisés qui possèdent une chaîne hydrocarbonée de 16 à 18 carbones constituent plus de 90 % de tous les acides gras cellulaires. Les précurseurs de la synthèse des acides gras proviennent de l'oxydation du glucose et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras en acétyl-CoA, qui s'accumule dans la matrice mitochondriale et entre dans le cycle de Krebs. Cet acétyl-CoA passe alors dans le cytosol

sous forme de citrate, grâce au transporteur des tricarboxylates. La voie de biosynthèse se poursuit par l'action de l'ATP-citrate lyase qui reforme l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate. Les molécules d'acétyl-CoA sont alors carboxylées en malonyl-CoA par l'ACC, la principale enzyme régulatrice de la voie de synthèse. L'estérification de l'acide gras en formation est réalisée par la FAS qui utilise le malonyl-CoA, l'acétyl-CoA et le NADPH. Le principal acyl-CoA produit par la FAS est le palmitoyl-CoA (16 : 0) qui sera ensuite converti en stéaryl-CoA (18 : 0). Cette élongation est réalisée au niveau du réticulum endoplasmique, grâce à l'action d'élongases. Chaque addition de deux carbones nécessite quatre réactions successives permettant la condensation du malonyl-CoA avec l'acyl-CoA (figure 1.25) (Moon *et al.*, 2001). Ces esters d'acyl-CoA peuvent également être pris en charge par des désaturases, telles que la SCD 1, qui produit alors de l'oléate (C 18 : 1n-9). Les TAG sont enfin synthétisés à partir d'acyls-CoA et de glycérol 3-phosphate (G3-P) ou de dihydroxyacétone phosphate. La première étape de la synthèse de TAG est catalysée par la GPAT ou la dihydroxyacétone phosphate acyltransférase.

#### I.4.4.2 Lipolyse

Fortement exergonique par rapport à l'oxydation du glucose, la  $\beta$ -oxydation d'un acide gras assure la formation de nombreux ATP. Par exemple, l'oxydation d'une molécule de palmitate permet la production nette de 129 molécules d'ATP, alors qu'une molécule de glucose n'en produit que 36 (Delbart, 2000).

Cette voie de dégradation commence par l'activation, dépendante de l'ATP, de l'acide gras à longue chaîne en acyl-CoA, qui sera transporté du cytosol dans la matrice mitochondriale pour y subir la  $\beta$ -oxydation par le système enzymatique CPT (figure 1.26). Le premier composant du système est la CPT1, une protéine insérée dans la membrane mitochondriale externe (MME) qui catalyse la transestérification du groupement acyl sur la carnitine et ainsi permet son passage dans l'espace intermembranaire. Le complexe acyl-carnitine formé traverse alors la MMI via une translocase spécifique, l'ACT (AcylCarnitine Translocase). Le transester acyl-carnitine est ensuite clivée par la CPT2 associée au feuillet interne de la MMI, qui régénère l'acyl-CoA et la carnitine (Esser *et al.*, 1996) (McGarry *et al.*, 1983).

Alors que la CPT2 est une protéine commune à tous les tissus et est codée par un gène unique, la CPT1 existe sous au moins deux isoformes, désignées chez le rat, L-CPT1 (liver) et M-CPT1 (muscle). Chez le rat, le pattern d'expression de la L-CPT1 et de la M-CPT1 varie

selon l'état de différenciation adipocytaire. Alors que les pré-adipocytes expriment uniquement la L-CPT1, les adipocytes matures expriment principalement la M-CPT1. Contrairement à ce modèle, il est décrit que la souris exprime exclusivement l'isoforme L-CPT1, aussi bien dans les pré-adipocytes que dans les adipocytes différenciés (Brown *et al.*, 1997). Ces deux isoformes possèdent également des paramètres cinétiques différents ( $K_m$  L-CPT1 : 30 $\mu$ M et  $K_m$  M-CPT1 : 500 $\mu$ M) (Brown *et al.*, 1997). Cependant, ces études de recherche du taux de transcrits de la M-CPT1 a été faite en Northern blot, et cette technique n'est pas assez sensible que pour détecter la faible abondance des transcrits de la M-CPT1.

La régulation du flux d'acide gras dans la mitochondrie par le système CPT s'exerce principalement au niveau de la CPT1, qui constitue ainsi une étape limitante de la  $\beta$ -oxydation.

#### *1.4.5 La $\beta$ -oxydation mitochondriale*

Cet ensemble de réactions permet à chaque cycle, l'élimination de deux carbones sous forme d'acétyl-CoA, la formation d'un acyl-CoA ( $C_{n-2}$ ), de la production de cofacteurs réduits nécessaires au fonctionnement des phosphorylations oxydatives. (figure 1.27).

L'activité respective des voies de biosynthèse et de  $\beta$ -oxydation des acides gras est étroitement contrôlée par différents mécanismes de régulation.

#### *1.4.6 Régulation du métabolisme des acides gras*

Le métabolisme des acides gras est étroitement régulé par des mécanismes à court et à long terme afin de maintenir une homéostasie énergétique.

##### 1.4.6.1 Régulation à court terme

L'ACC est l'enzyme régulatrice clé du système qui catalyse la synthèse du malonyl-CoA, précurseur de la synthèse des acides gras. Cette molécule inhibe de manière allostérique la protéine CPT1, empêchant ainsi l'estérification et le transport des acyls-CoA dans la mitochondrie. Les isoformes L-CPT1 et M-CPT1 ont des sensibilités différentes vis-à-vis du malonyl-CoA. En effet, les concentrations en malonyl-CoA pour lesquelles on observe une diminution d'activité de l'enzyme de 50 % ( $IC_{50}$ ) sont respectivement de 3  $\mu$ M et de 0,03 $\mu$ M pour les isoformes L-CPT1 et M-CPT1 (Brown *et al.*, 1997). Une diminution de

la concentration en malonyl-CoA dans la cellule s'accompagne donc d'une augmentation d'activité de la CPT1 et donc en théorie, du processus de  $\beta$ -oxydation (figure 1.28) (Muoio *et al.*, 1999).

C'est également par le taux de malonyl-CoA dans la cellule que l'on explique l'effet de l'AMPK (5'-AMP-dépendent Protein Kinase) sur l'équilibre entre les voies de dégradation et de biosynthèse des acides gras. L'AMPK est une sérine/thréonine kinase trimérique qui est structurée par une sous-unité catalytique  $\alpha$  associée à d'autres sous unités non catalytiques ( $\beta$ ,  $\gamma$  essentielles à l'activation de l'enzyme (Vavvas *et al.*, 1997). Cette kinase est activée par différents stress métaboliques menant à l'augmentation du ratio AMP/ATP intracellulaire. Le mécanisme d'activation de cette kinase est très complexe. L'interaction de l'AMP avec l'AMPK active cette dernière par une régulation allostérique et induit un changement conformationnel qui augmente sa capacité à devenir un meilleur substrat pour son activateur, l'AMPKK. Cette kinase en amont, également activée par l'AMP, phosphoryle l'AMPK au niveau de sa sous-unité  $\alpha$  sur la thréonine 172. De plus, le changement conformationnel diminue la reconnaissance de l'AMPK par des protéines phosphatases pouvant l'inactiver (Davies *et al.*, 1989) (Moore *et al.*, 1991). Une fois activée, l'AMPK phosphoryle notamment l'ACC et l'inactive, ce qui diminue la synthèse de malonyl-CoA et permet donc la  $\beta$ -oxydation des acides gras, suite à la levée d'inhibition exercée par le malonyl-CoA sur la CPT1 (figure 1.28) (Muoio *et al.*, 1999).

De plus, l'AMPK inhibe la GPAT insérée dans la MME et qui constitue la première étape de la synthèse des glycérolipides [Vavvas, 1997 #189]. L'AMPK protège donc la cellule contre une déplétion en ATP en inhibant la voie de biosynthèse et favorise la voie de  $\beta$ -oxydation des acides gras, afin de générer de l'énergie (Hardie *et al.*, 1997).

#### I.4.6.2 Régulation à long terme : régulation de l'expression génique par les acides gras

Les acides gras, les acyls-CoA ou leurs dérivés régulent également la transcription de gènes par différents mécanismes (figure 1.29). Les acides gras peuvent induire une cascade d'événements menant à la modification covalente de facteurs de transcription, par phosphorylation/déphosphorylation, ce qui provoque une altération de leur activité. Ils peuvent directement se lier et activer un facteur de transcription, en agissant comme ligands. Ils vont également modifier leur stabilité ou influencer leur taux de transcription et ainsi modifier leur synthèse *de novo*. Les facteurs de transcription associés aux acides gras peuvent

se lier aux séquences FARE (Fatty Acid-Response Element), situés dans la région promotrice des gènes cibles, sous forme monomérique et sous forme homo- ou hétérodimérique.

Nous terminerons ce chapitre en illustrant le contrôle des acides gras sur l'expression de gènes par quelques exemples.

### *I.4.6.2.a Régulation négative*

Des études récentes ont montré que seuls les acides gras polyinsaturés sont capables de réprimer l'expression de gènes codant pour la FAS, l'ACC, la L-PK, l'ATP citrate-lyase, la SCD1 et le transporteur GLUT4 (Sessler *et al.*, 1998). Le mécanisme proposé est que les enzymes biosynthétiques dont les gènes sont activés par le glucose contribuent à augmenter le ratio AMP/ATP dans la cellule et donc à activer l'AMPK. Cette dernière participerait à l'effet « *épargne du glucose* » en inhibant le métabolisme du glucose en présence d'acides gras. En effet, par la phosphorylation et donc l'inactivation du facteur de transcription ChREBP par l'AMPK (voir point I.3.6), celle-ci empêche l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse et la lipogenèse. Ce mécanisme permet ainsi à la cellule de maintenir un ratio ATP/AMP positif (Woods *et al.*, 2000) (Kawaguchi *et al.*, 2001). Dans les cellules 3T3-L1, l'acide arachidonique (AA)(C<sub>20</sub> : 4n-6) réprime l'expression des gènes impliqués dans la différenciation tel que la GPDH, par un mécanisme dépendant d'un de ses dérivés, la PGF<sub>2</sub>α (Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha) (Kamon *et al.*, 2001).

Les SREBPs sont essentiels à la régulation de l'homéostasie lipidique. Alors que SREBP 1a et SREBP 1c stimulés par l'insuline et le glucose, participent à la synthèse de la FAS (Latasa *et al.*, 2000), ces facteurs de transcription sont réprimés par les acides rétinoïques et les acides gras. Worgall *et al.* (1998) montrent que seuls les acides gras polyinsaturés diminuent l'expression des gènes contenant des séquences SRE dans leur région promotrice, en réduisant la quantité de SREBPs cytoplasmique (Worgall *et al.*, 1998).

Bien qu'il existe une région de la séquence promotrice de ces gènes qui réponde aux acides gras polyinsaturés, les mécanismes répresseurs ne sont pas encore connus (Jump *et al.*, 1999).

### *I.4.6.2.b Régulation positive*

Déjà connus pour induire l'expression du gène codant pour ALBP/aP2, les acides gras à longue chaîne aussi bien saturés qu'insaturés jouent un rôle dans les processus d'adipogenèse

et de lipogenèse. Des études ont montré que de nombreux marqueurs du phénotype adipocytaire tels que les protéines FACS, LPL, CPT, GLUT1 et GLUT4 sont induits par différents acides gras. C'est le cas notamment de l'acide arachidonique et certains de ses dérivés, les 15-déoxy-delta 12,14 J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), les PGD<sub>2</sub> et les PGI<sub>2</sub>, qui sont des ligands spécifiques et physiologiques de PPAR $\alpha$  (Kamon *et al.*, 2001) (Nugent *et al.*, 2001).

En conclusion, la différenciation adipocytaire est un programme très complexe impliquant l'utilisation de différents substrats énergétiques tels que les acides gras, de nombreuses voies de signalisation dont celle de l'insuline, différents facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes nécessaires à ce processus, notamment ceux qui sont responsables de la synthèse et l'accumulation de TAG. La régulation de ces différents mécanismes est réalisée à différents niveaux : systémique, cellulaire et moléculaire.

## ***Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire***

Un nouveau sujet de recherche qui porte sur la différenciation des adipocytes blancs ou adipogenèse *in vitro* a récemment été lancé au sein de l'URBC. L'adipogenèse est un processus de plus en plus étudié ces dernières années, en particulier en raison de l'incidence croissante de l'obésité et des pathologies associées dans les pays industrialisés. Les nombreuses études, menées à différents niveaux, portent sur le rôle joué par certains facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes marqueurs spécifiques nécessaires à la différenciation des adipocytes, sur les voies de transduction impliquées dans la régulation de ce processus ou encore sur les interactions du tissu adipeux avec d'autres organes (foie, muscle squelettique, hypothalamus...) par la libération de différentes cytokines ou adipokines. Ces études nous montrent que le programme de différenciation est très complexe et que les adipocytes jouent plus qu'un rôle de stockage des TAG dans l'organisme.

Cependant, de nombreuses questions restent sans réponses dans ce domaine de recherche. En particulier, le rôle des organites subcellulaires tels que la mitochondrie au cours de la différenciation des adipocytes blancs sont très peu étudiés. Au laboratoire, nous nous focalisons essentiellement sur la contribution de la mitochondrie à l'adipogenèse. Pour se faire, nous utilisons des inhibiteurs de l'activité mitochondriale ayant pour cible les complexes assurant les phosphorylations oxydatives, et nous observons les effets d'un dysfonctionnement mitochondrial sur la cellule pré-adipocytaire.

## ***Résumé des recherches antérieures à ce mémoire***

Nous travaillons sur une lignée de pré-adipocytes embryonnaires murins (3T3-L1) utilisée dans de nombreuses études portant sur la différenciation des adipocytes blancs. Nous avons précédemment montré qu'une inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale dans les pré-adipocytes, induite par des inhibiteurs métaboliques tels que l'antimycine A et l'oligomycine, entraîne l'apparition de petites vésicules de triacylglycérols dans le cytoplasme de ces cellules. Ces vésicules sont mises en évidence après 8 jours d'inhibition mitochondriale par une coloration à l'Oil Red O. Ce colorant possède une affinité très forte pour les graisses neutres et permet de détecter la présence de triacylglycérols et de quantifier leur accumulation en mesurant l'absorbance des tapis cellulaires après coloration au spectrophotomètre.

Cependant, ce phénotype n'est pas induit par toutes les molécules capables d'inhiber les phosphorylations oxydatives mitochondriales. En effet, le FCCP (un agent découplant) n'entraîne pas l'apparition de ces vésicules de triglycérides. De plus, nous observons que les vésicules obtenues suite à une inhibition mitochondriale sont plus petites que celles accumulées dans les 3T3-L1 dont la différenciation est induite selon un protocole standard. Pour cette raison, nous appellerons le phénotype induit par les inhibiteurs mitochondriaux tel que l'antimycine A, phénotype « adipocyte-like ». Dans le cadre de sa thèse de doctorat, S. Vankoningsloo s'intéresse aux mécanismes responsables de l'apparition de ce phénotype adipocyte-like par l'étude de l'activation de facteurs de transcription, l'importance de certaines kinases et l'expression différentielle de gènes. Nous réalisons systématiquement des études comparatives entre le modèle standard d'induction de la différenciation avec un cocktail hormonal et le modèle d'acquisition du phénotype "adipocyte-like" induit par les inhibiteurs de la mitochondrie, afin de rechercher les similitudes et les différences entre ces deux modèles.

### ***Objectifs de ce mémoire***

Le but de ce travail est donc de rechercher et de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'apparition du phénotype « adipocyte-like ». Il est évident que la cellule soumise à une inhibition mitochondriale pendant plusieurs jours doit adapter son régime métabolique et probablement l'expression d'un certain nombre de gènes. Ces événements passent par l'activation ou l'inhibition de certaines voies de transduction, par la régulation de l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription, par l'expression ou la répression de certains gènes, par des changements dans les flux ioniques et de métabolites qui sous-tendent les réponses de la cellule à certaines inhibitions.

Dans le cadre de ce mémoire, nous étudierons les flux de métabolites énergétiques tels que le glucose et les acides gras à travers la membrane plasmique en réponse à l'inhibition de la mitochondrie. Nous comparerons les résultats obtenus avec ceux observés dans le modèle de différenciation adipocytaire induite par un cocktail de différenciation standard.

Enfin, après avoir quantifié l'incorporation de glucose dans ces conditions expérimentales, nous nous intéresserons à la voie de signalisation et aux mécanismes moléculaires impliqués dans le transport du glucose. Dans une expérience préliminaire, nous



rechercherons l'effet du glucose cellulaire sur l'activation d'un facteur de transcription connu pour réguler les gènes de la glycolyse et de la lipogenèse.

Etant donné l'importance du devenir des acides gras après activation et le rôle de la  $\beta$ -oxydation de ces molécules dans la cellule en différenciation, nous nous intéresserons également au devenir des acides gras incorporés. Pour cela, nous étudierons le transport des acides gras dans la mitochondrie et leur  $\beta$ -oxydation subséquente au sein de la matrice mitochondriale dans nos modèles cellulaires. Le rôle-clé de la CPT-1 dans ces processus nous obligera à considérer l'étude de l'activité de la CPT-1. Pour cela, nous étudierons le taux d'expression des différentes isoformes de la CPT par la technique de PCR en temps réel et mesurerons directement l'activité de l'enzyme.

## ***II Matériels et méthodes.***

### ***II.1 Culture cellulaire et sous-cultures.***

#### ***II.1.1 Culture :***

Les cellules 3T3-L1 sont des pré-adipocytes embryonnaires murins et proviennent de l'ATCC. (American Tissue and Cell Collection, USA). Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (T75, Corning, USA) dans du milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium contenant 4,5 g/l de glucose (High Glucose)( Gibco BRL, Grande-Bretagne) et 10 % de SVF (sérum de veau foetal) (Gibco BRL, Grande-Bretagne). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une étuve contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (Heraeus, Allemagne).

#### ***II.1.2 Méthodes des sous-cultures :***

Les sous-cultures sont réalisées sur des cellules dont la densité atteint 80 % de confluence. Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline : 0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH 7,4) préchauffé à 37°C dans le but d'éliminer les résidus de sérum. On ajoute ensuite 1 ml d'une solution de trypsine (0,5 g/l) et d'EDTA (Ethylène Diamine Tétracétique, Gibco BRL) à 0,53 mM. Le détachement des cellules est visualisé au microscope à contraste de phase. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume de 10 ml de DHG contenant 10 % de SVB et fractionnées dans de nouvelles boîtes de cultures T75 ou dans des boîtes multipuits, en fonction du type d'expérience à réaliser.

## ***II.2 Différenciation et incubations des cellules avec les inhibiteurs mitochondriaux***

### ***II.2.1 Programme de différenciation des cellules 3T3-L1 :***

La mise au point d'un modèle de différenciation de pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes a été effectuée au laboratoire sur base du protocole décrit par Student *et al.* (1980) (Student *et al.*, 1980)\*. Les cellules sontensemencées à 50 % de confluence (en surface) dans des boîtes de 12 ( $\pm 4 \text{ cm}^2$ ) ou de 24 puits ( $\pm 2 \text{ cm}^2$ ) (Corning, USA). Après trois jours, les cellules confluentes (jour 0) sont incubées pendant 48 h dans du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) composé de 5  $\mu\text{g/ml}$  d'insuline (Gibco BRL, Grande-Bretagne), 300  $\mu\text{M}$  dibutyryl-AMP cyclique (db-AMPC) (Sigma, USA) et de 1  $\mu\text{M}$  dexaméthasone (Sigma, USA). Ces molécules sont diluées dans du DHG-L1 contenant 1,5 g/l de  $\text{NaHCO}_3$  et 10 % de SVF. Le milieu est renouvelé toutes les 48 h par du DHG-L1 contenant 10 % de SVF et 5  $\mu\text{g/ml}$  d'insuline (Gibco BRL, Grande-Bretagne).

### ***II.2.2 Traitement chronique des cellules 3T3-L1 avec les inhibiteurs de l'activité mitochondriale :***

Les cellules sontensemencées à 50 % de confluence (jour – 3) dans des boîtes de 12 ou de 24 puits (Corning,USA). Arrivées à confluence (jour 0), elles sont incubées en présence de l'inhibiteur d'intérêt antimycine A (10 nM) ou FCCP (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma, USA) dilué dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVF. L'inhibiteur est ajouté toutes les 48 h à chaque renouvellement de milieu. Les modèles d'étude mis aux points et standardisés sont schématisés à la figure 2.1 .

## ***II.3 Coloration des triacylglycérols à l'Oil Red O.***

Il existe plusieurs méthodes de visualisation et de quantification des triacylglycérols. La plus courante se base sur la fixation d'un colorant ayant une forte affinité pour les graisses neutres (Koopman *et al.*, 2001). La solution de coloration est préparée à partir d'Oil Red O stock dilué à 0,2 % dans l'isopropanol (Merck, Allemagne) et de dextrine (Sigma, USA) à 1

% dans l'eau dans un rapport 3/2 (v/v). Après 10 min, ce mélange est filtré sur un filtre 2V (Whatman, Grande-Bretagne).

Les cellules sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 24 puits dans du DHG contenant 10 % de SVF. Trois jours plus tard, les 3T3-L1 sont incubées ou non (cellules contrôle) en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3), avec l'inhibiteur mitochondrial AA (10 nM) ou l'agent découplant FCCP (1  $\mu$ M). Les tests de coloration sont réalisés après 1, 2, 3, 4, 7 et 8 jours d'incubation. Le protocole de coloration commence par un rinçage des cellules avec 1 ml de PBS, suivi d'une fixation à la paraformaldéhyde 3,7 % (PFA ; Merck, Allemagne) pendant 2 min. Ensuite, les cellules sont incubées en présence de 0,5 ml de colorant pendant 30 min et rincées 2 fois avec 1ml de PBS. Les vésicules de triacylglycérols (TAG) sont visualisées au microscope à contraste de phase et des microphotographies des cellules sont prises pour documenter les différentes conditions expérimentales. La mesure de l'absorbance des tapis cellulaires après coloration est réalisée au spectrophotomètre à 490 nm (Ultramark, Biorad, Allemagne). Cette mesure permet donc la quantification de l'accumulation de TAG dans les cellules et donc de leur degré de différenciation.

Les résultats sont exprimés en unités de densité optique (D.O.) après avoir soustrait des blancs. Les blancs correspondent aux valeurs obtenues après coloration de puits ne contenant pas de cellules. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  un écart-type pour 3 tests (n=3).

## ***II.4 Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée.***

Par cette technique, nous avons testé l'effet du cocktail inducteur de la différenciation ou d'un traitement avec un inhibiteur de l'activité mitochondriale sur la prolifération cellulaire. En effet, ce test permet d'estimer la proportion des cellules en phase de synthèse de l'ADN (phase S) (Houglum *et al.*, 1997).

### ***II.4.1 Principe***

Pendant la division cellulaire, l'incorporation de nouveaux nucléotides est nécessaire à la synthèse de l'ADN. Après une incubation des cellules avec du milieu contenant de la [ $^3$ H]-thymidine, la quantité de radioactivité associée à la population cellulaire sera d'autant plus importante que l'activité mitotique des cellules est intense. Le comptage de la radioactivité est

réalisé après rinçages et précipitation des protéines au TCA (Tri-Chloro Acetic Acid). Les valeurs obtenues sont rapportées aux quantités de protéines.

#### *II.4.2 Méthode :*

##### II.4.2.1 Sous-culture et incubations :

Les cellules sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 12 puits (Corning, USA) dans du DHG contenant 10 % de SVF. Trois jours plus tard, les 3T3-L1 sont incubées ou non (cellules contrôles, CTL) dans du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3), l'inhibiteur mitochondrial AA (10 nM) ou l'agent découplant FCCP (1  $\mu$ M). Les tests d'incorporation sont réalisés après 5 h ou après 2, 4 et 8 jours d'incubation. Pour l'incorporation, les cellules sont incubées pendant 4 h dans une étuve à 37°C contenant 5 % de CO<sub>2</sub> avec 0,5 ml de milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVF et 1  $\square$ Ci/ml de [<sup>3</sup>H]-thymidine (Nen, USA) .

##### II.4.2.2 Précipitation et mesure de la radioactivité associée

Les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS, une fois avec 1 ml d'acide trichloroacétique 10 % et enfin avec 1 ml d'éthanol 70 %. Ces différents traitements permettent de précipiter les protéines dont celles qui sont associées à l'ADN. Les protéines sont ensuite hydrolysées dans 200  $\square$ l de NaOH (0,5 N) pendant 45 min sous agitation. On homogénéise ensuite l'hydrolysat obtenu avant de prélever 25  $\square$ l dans le but de réaliser un dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Un équivolume de HCl (0,5 N) est alors ajouté aux 175  $\square$ l restants afin de neutraliser l'hydrolysat. En effet, le NaOH peut affecter les résultats de comptage par un effet de *quenching* de la radioactivité. Après homogénéisation, 300  $\square$ l sont récoltés dans une fiole de comptage et dilués dans 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). Le comptage de la radioactivité est réalisé dans un compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, USA) et les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute). Un blanc est également réalisé en mesurant la quantité de [<sup>3</sup>H]-thymidine contaminante, c'est-à-dire associée à la surface cellulaire mais non incorporée. Ceci se fait en ajoutant 0,5 ml de milieu contenant [<sup>3</sup>H]-thymidine (1  $\square$ Ci/ml) sur les cellules, avant de les rincer et de les lyser immédiatement. Ces valeurs sont soustraites des valeurs de cpm obtenues pour les tests et ces dernières sont

ensuite rapportées à la quantité de protéines. Les résultats sont donc exprimés en cpm/µg de protéines.

### ***II.5 Mesure de l'incorporation de 2-déoxy-D-glucose tritié.***

Nous avons utilisé cette technique, afin de quantifier l'incorporation de glucose par des 3T3-L1 incubées en présence ou non du cocktail inducteur de la différenciation ou par des cellules incubées en présence d'inhibiteurs des phosphorylations oxydatives tels que l'antimycine A et le FCCP.

#### ***II.5.1 Principe :***

La cellule peut moduler son taux d'incorporation de glucose en fonction des conditions dans lesquelles elle se trouve. On peut déterminer la quantité de glucose incorporé dans des cellules répondant à une condition expérimentale grâce à des traceurs radioactifs tels que le 3-O-D-[methyl-<sup>3</sup>H] glucose et le 2-déoxy-[1, 2-<sup>3</sup>H]-D-glucose, qui est la molécule que nous utiliserons dans ce travail (Loike *et al.*, 1992). Elle entre par des transporteurs de glucose et est phosphorylée en glucose 6-phosphate mais n'est pas métabolisée davantage dans la cellule. La radioactivité associée à la population cellulaire est donc le reflet du taux d'incorporation de glucose par les cellules et permet donc de mesurer le flux de glucose à travers la membrane plasmique.

#### ***II.5.2 Méthode***

##### **II.5.2.1 Sous-culture et incubations**

Pour réaliser différentes cinétiques, les 3T3-L1 sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 12 puits (Corning, USA) dans du DHG contenant 10 % de SVF. Trois jours plus tard, les 3T3-L1 sont incubées ou non dans du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3), ou l'inhibiteur mitochondrial AA (10 nM) ou l'agent découplant FCCP (1 µM). Les cellules sont ensuite incubées en présence d'insuline pendant des temps croissants allant de 10 min à 5 h, suivi d'une incubation de 30

min à 37°C en présence de 2-déoxy-D-[1, 2-<sup>3</sup>H] glucose (29,80 Ci/mmol), dilué dans du PBS à 1  $\mu$ Ci/ml.

Pour la mesure de l'incorporation à différents temps du programme de différenciation, les 3T3-L1 sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 12 puits . Trois jours plus tard, elles sont traitées ou non en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou d'un inhibiteur de l'activité mitochondriale (AA 10 nM et FCCP 1 $\mu$ M) et les tests sont réalisés après 5 h, ou 1, 2, 4 et 8 jours suivant le début des incubations. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 min à 37°C en présence de 2-déoxy-[1, 2-<sup>3</sup>H]-D-glucose, dilué dans du PBS à 1  $\mu$ Ci/ml. Dans certaines conditions, la cytochalasine B (40 nM) est ajoutée au moment du test d'incorporation.

#### II.5.2.2 Lyse et dosage :

Après 2 rinçages avec 1 ml de PBS, les cellules sont lysées dans 200  $\mu$ l de NaOH 0,5 N pendant 45 min et sous agitation. Les lysats sont homogénéisés et 25  $\mu$ l sont prélevés afin de réaliser un dosage protéique par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Un équivalent de HCl (0,5 N) est ajouté aux 175  $\mu$ l restants afin de neutraliser le lysat. Enfin, 300  $\mu$ l sont prélevés dans une fiole de comptage et dilués dans 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). Le comptage de la radioactivité est réalisé dans un compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, USA). Un blanc est également réalisé en mesurant la quantité de radioactivité contaminante associée aux surfaces cellulaires, comme décrit au point II.4.2.2. Les résultats sont exprimés en cpm/ $\mu$ g de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  un écart-type pour 3 tests (n=3).

### ***II.6 Western blotting.***

Cette technique nous a permis de visualiser l'abondance et le niveau d'expression du transporteur de glucose (GLUT1) dans des cellules 3T3-L1 dont la différenciation est induite par le cocktail inducteur ou de cellules incubées en présence d'antimycine A (10 nM).

### *II.6.1 Principe :*

La première étape de cette technique consiste à séparer les protéines d'un lysat cellulaire (lysat clair) en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de polyacrylamide soumis à une différence de potentiel permettant la migration des protéines. Un marqueur de poids moléculaire permet d'estimer le poids moléculaire de la protéine d'intérêt. L'étape de transfert semi-dry se fait par la migration des protéines contenues dans le gel sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). La membrane est alors soumise à un blocage afin de minimiser la fixation non spécifique des anticorps utilisés. Ensuite, on incube également la membrane dans une solution contenant un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Un contrôle de charge est effectué avec un anticorps dirigé contre une protéine dont l'expression n'est pas affectée par la condition expérimentale. La troisième étape consiste à incuber la membrane avec un anticorps secondaire dirigé contre les fragments Fc de l'anticorps primaire. Cet anticorps est conjugué à la HRP (Horse Radish Peroxydase).

Enfin, l'étape de révélation en chimioluminescence (ECL) est réalisée en ajoutant le substrat de la peroxydase contenant du luminol et un amplificateur, permettant ainsi l'émission de photons pouvant imprimer un film autoradiographique (figure 2.2).

### *II.6.2 Méthodes :*

#### II.6.2.1 Sous-cultures et préparation des lysats clairs :

Les cellules 3T3-L1 sont repiquées dans des T75 (Corning, USA) à 50 % de confluence dans du milieu DHG + 10 % de SVF. Trois jours plus tard, les cellules sont incubées dans du DHG –L1 + 10 % de SVF contenant le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou de l'antimycine A (10 nM). Aux jours 1, 2, 3, 4, 7 ou 9 suivant le début des incubations, les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de PBS puis lysées dans 800  $\mu$ l de tampon de lyse (40 mM Tris ; pH 7,5 ; 300 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases en tablettes (Roche, Allemagne). Les lysats totaux sont centrifugés 15 min à 13000 rpm (4°C). Un aliquot du lysat clair (surnageant) de chaque condition est utilisé pour le dosage de protéines, réalisé par la méthode du « BCA protein assay kit » (Pierce, Grande Bretagne). Le principe de cette méthode consiste en la réduction de l'ion cuivre par les protéines contenues dans un solvant alcalin. L'ion monovalent généré réagit avec l'acide



bicinchoninique (BCA) formant ainsi un complexe violet qui possède une forte absorbance à 562 nm (figure 2.3).

#### I.1.1.2 Préparation des échantillons :

Le volume de l'échantillon chargé est de 50  $\mu$ l contenant :

- 20  $\mu$ g de protéines, portés à 40  $\mu$ l avec du tampon de lyse,
- 10  $\mu$ l de Laemmli Sample Buffer 5 X (0,5 M Tris pH 6,8, 20 % SDS, 20 % glycérol, 1 % bleu de bromophénol, 20 %  $\beta$ -mercapto-éthanol) (Laemmli, 1970).

Les échantillons sont alors bouillis à 100°C pendant 5 min pour assurer une bonne dénaturation, refroidis sur glace puis centrifugés pendant 30 s à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne). Ils sont ensuite chargés dans les puits du gel de polyacrylamide, ainsi que 20  $\mu$ l du marqueur de poids moléculaire See Blue (In Vitrogen, Pays-Bas).

#### II.6.2.3 Préparation des gels SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et migration :

La migration des protéines se déroule dans deux gels de composition différentes :

Le premier gel (stacking gel) concentre les protéines et sa composition est la suivante (pour 20 ml):

- 2,2 ml de polyacrylamide 40 % (Pharmacia Biotech, Suède) et de bis-acrylamide 3 % (Pharmacia Biotech, Suède)
- 7,8 ml H<sub>2</sub>O
- 10 ml de Tampon B (121 ml Tris-HCl 2 M pH 6,8; 4 ml de Tris-base 2 M ; 10 ml de SDS 20 % ; 365 ml H<sub>2</sub>O)
- 80  $\mu$ l d'ammonium persulfate (APS) 25 % (Pharmacia Biotech, Suède)
- 30  $\mu$ l de TEMED (Pharmacia Biotech, Suède).

Le second gel (running gel) est un gel de séparation des protéines selon leur poids moléculaire et sa composition est la suivante pour un gel 10 %:

- 10 ml de polyacrylamide 40 % (Pharmacia Biotech, Suède) et de bis-acrylamide 3 % (Pharmacia Biotech, Suède).
- 10 ml H<sub>2</sub>O
- 20 ml de Tampon A (90 ml Tris-HCl 2 M pH 8,8 ; 285 ml de Tris-base 2 M ; 10 ml SDS 20 % ; 115 ml H<sub>2</sub>O)

- 200  $\mu$ l d'ammonium persulfate (APS) 25 % (Pharmacia Biotech, Suède)
- 75  $\mu$ l de TEMED (Pharmacia Biotech, Suède).

Ces gels sont coulés entre des plaques de montage et polymérisent pendant 30 min à température ambiante. Le gel est alors placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration. La migration s'effectue dans du tampon de migration de composition : 0,05M Tris-base ; 0,3 M glycine et 0,1 % SDS. Les protéines migrent dans le gel de concentration pendant 45 min dans un courant de 35 mA puis à travers le gel de séparation pendant plusieurs heures à 45 mA.

#### II.6.2.4 Transfert sur membrane de PVDF :

Cette étape est réalisée dans un tampon de transfert de composition : 0,5 M Tris-base, pH 8,3 ; 0,76 M glycine ; 0,1 % SDS et 15 % méthanol. Après le démoulage du gel, un montage en « sandwich » (figure 2.4) est soumis pendant 16 h à une différence de potentiel généré par un courant de 55 mA) permettant ainsi le transfert des protéines sur la membrane de PVDF (Hyperfilm MP Amersham, Grande-Bretagne).

#### II.6.2.5 Incubations de la membrane avec les anticorps et révélation :

Afin de saturer les sites non spécifiques auxquels pourraient se lier les anticorps utilisés, la membrane est bloquée pendant 3 h à température ambiante dans du tampon TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween) de composition : 2,4 g/l Tris; pH 7,4 ; 8 g/l NaCl et 0,1 % Tween 20) et 5 % de lait (Gloria, Nestlé, Belgique). Afin de s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée dans les différents puits, on effectue un contrôle de charge qui consiste en l'utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine dont l'abondance est connue pour ne pas varier dans nos conditions expérimentales. Dans notre cas, ce contrôle de charge est réalisé par l'anticorps dirigé contre la protéine TFIID (TBP ou TATA Box binding Protein).

La membrane est ensuite incubée 2 h à température ambiante avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-GLUT1 ou l'anticorps polyclonal de lapin anti-TFIID (Santa Cruz Biotechnology, USA) à la dilution de 1  $\mu$ g/ml dans du TBS-T contenant 5 % de lait. Elle est ensuite rincée 3 fois 5 min dans du TBS-T contenant 5 % de lait (Gloria, Nestlé, Belgique). Ensuite, elle est incubée 45 min à température ambiante avec l'anticorps de lapin dirigé contre les anticorps de chèvre, soit l'anticorps d'âne dirigé contre les anticorps de lapin (Santa Cruz Biotechnology, USA) couplés à la HRP. Ces anticorps secondaires sont dilués 2000 fois dans

du TBS-T contenant 5 % de lait. La membrane est enfin rincée 3 fois 20 min dans du TBS-T avant d'être incubée avec le substrat de la HRP (Système de révélation ECL, Pierce, Grande Bretagne). Un film autoradiographique (Hyperfilm MP Amersham, Grande-Bretagne) est exposé sur la membrane en chambre noire, afin d'obtenir une exposition optimale. Il est ensuite plongé dans une solution de révélateur (Ilford 200 RT, Ilford, Grande Bretagne), lavé à l'eau distillée et fixé dans une solution de fixateur (Ilford 200 RT, Ilford, Grande Bretagne) avant d'être lavé à l'eau courante, séché et scanné.

## ***II.7 Marquage des isoformes GLUT1 et GLUT4 et visualisation en microscopie confocale***

Nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence des isoformes de transporteur de glucose GLUT1 et GLUT4 exprimés et/ou transloqués au niveau de la membrane plasmique de cellules 3T3-L1 incubées dans du DHG -L1 + 10 % de SVF en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou d'inhibiteurs de l'activité mitochondriale (AA 10 nM; FCCP 1  $\mu$ M).

### ***II.7.1 Principe :***

Les cellules incubées dans les différentes conditions sont fixées, perméabilisées ou non et incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Après les rinçages et le blocage au PBS/BSA, on ajoute un anticorps secondaire dirigé contre les fragments Fc des anticorps primaires et couplé à un fluorochrome. La ré-émission de photons par le fluorochrome après excitation par une longueur d'onde spécifique permet la révélation du marquage et donc une observation au microscope confocal à fluorescence.

### ***II.7.2 Méthodes :***

#### ***II.7.2.1 Sous-culture et incubations :***

Les 3T3-L1 sont repiquées à 50 % de confluence dans une boîte de 24 puits (Corning, USA) dans lesquels sont préalablement placées des lamelles couvre-objets (Vel, Knittel Glaser, Allemagne) stérilisées. Trois jours plus tard, les cellules sont incubées dans du DHG-

L1 + 10 % de SVF contenant les inhibiteurs de l'activité mitochondriale (AA, 10 nM ; FCCP, 1  $\mu$ M) ou le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3). Après deux jours d'incubation, nous réalisons le marquage immunocytochimique.

#### II.7.2.2 Marquage de GLUT1 et GLUT4 :

Les cellules sont rincées dans 1 ml de PBS préchauffé à 37°C, puis fixées pendant 10 min avec 1 ml d'une solution de paraformaldéhyde (Merck, Allemagne) à 3 % et préchauffée à 37°C. Les cellules sont perméabilisées ou non au Triton X 100 à 1% dans du PBS. Les 3T3-L1 sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS contenant 1 % de sérum albumine bovine (BSA, Sigma, USA) puis sont incubées 16 h à 4°C avec 30  $\mu$ l d'anticorps de chèvre anti-GLUT1 ou anti-GLUT4 dirigé contre le domaine intracellulaire (COOH-terminal) ou extracellulaire (NH<sub>2</sub>-terminal) du transporteur (Santa Cruz, USA) dilué à 2  $\mu$ g/ml dans du PBS contenant 1% de SAB. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS contenant 1% de SAB et incubées 1 h à température ambiante et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire (anti-Ig) de chèvre couplé à un fluorochrome (Alexa, Molecular Probes, USA). L'anticorps secondaire est dilué 500 fois dans du PBS contenant 1 % de BSA. Les 3T3-L1 sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS contenant 1 % de BSA et enfin 1 fois avec 1 ml de PBS avant de réaliser le montage. Les lamelles couvre-objets (Sigma-Aldrich, Angleterre) sont retournées sur une goutte de Mowiol et déposées sur une lame porte-objet (Assistant, Allemagne). Ces lames (Memzel-Gloser, Allemagne) sont ensuite placées à 4°C et à l'obscurité pour permettre la polymérisation. L'observation des cellules au microscope confocal à fluorescence est réalisée avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm pour GLUT1 et de 568 nm pour GLUT4.

### ***II.8 Réaction d'amplification en chaîne en temps réel (Real Time PCR)***

Nous avons utilisé la technique de real time PCR afin de comparer les taux de transcrits des 2 isoformes de la CPT1 (M-CPT1 et L-CPT1) et de la CPT2 dans des cellules 3T3-L1 incubées en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou des inhibiteurs de l'activité mitochondriale (AA 10 nM et FCCP 1  $\mu$ M).

### *II.8.1 Principe*

La PCR permet l'amplification exponentielle et sélective de séquences d'ADN cible en utilisant des primers spécifiques de la séquence à amplifier. Le signal fluorescent accompagnant la synthèse d'ADN pendant la réaction est causé par le fluorochrome SYBR Green, une molécule non spécifique s'intercalant dans l'ADN double brin. La real time PCR permet de lier de manière proportionnelle la quantité de produits d'amplification (amplicons) à l'intensité de fluorescence générée par le fluorochrome et mesurée directement dans le tube PCR. Ceci est permis par le couplage d'un fluorimètre et d'un thermocycleur (ABI Prim 7000, Applied Biosystems, CA, USA). La figure 2.5 illustre la méthode d'incorporation d'une molécule fluorescente dans l'ADN double brin. L'inconvénient de ce système est qu'il peut mettre en évidence l'amplification de séquences non spécifiques. Ceci est évité à la fois par une étape Hot Start précédant la PCR et dans une étape par défaut par une détection après PCR en générant une courbe de dissociation de la double hélice d'ADN (figure 2.6).

Le protocole comprend deux grandes étapes que sont la "reverse transcription (RT)" permettant la synthèse d'ADN complémentaire à partir d'extraits d'ARN totaux et la PCR proprement dite. L'avantage de la séparation de ces étapes est de pouvoir générer un pool d'ADNc que l'on peut stocker et réutiliser. L'interprétation des résultats de la quantification de l'expression du gène d'intérêt nécessite la comparaison à un ou plusieurs "house keeping genes" (HKG). Les HKG sont des gènes dont la transcription ne varie pas dans la condition expérimentale étudiée. L'analyse des résultats requière également une normalisation de l'amplification maximale de la séquence cible par rapport à l'amplification minimale non spécifique (background).

### *II.8.2 Méthode*

#### II.8.2.1 Sous cultures, incubations et extraction des ARN totaux

Les 3T3-L1 sont cultivées dans des boîtes de T75 (Corning, USA). Elles sont soumises à un programme de différenciation en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou sont traitées avec l'AA (10 nM) ou le FCCP (1  $\mu$ M) dilués dans du DHG-L1 + 10 % de SVF et ce, pendant 8 jours. L'extraction de l'ARN total commence par une lyse cellulaire qui est suivie d'une extraction au phénol – chloroforme et d'une précipitation à l'isopropanol selon le protocole du manuel fourni avec le kit RNeasy Total RNA Isolation

System (Promega, USA). Après quantification au Gene Quant, les échantillons sont stockés à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Les différents extraits sont poolés par condition, dans le but de ne générer qu'un seul échantillon d'ARN qui sera ensuite rétrotranscrit en ADNc.

#### II.8.2.2 Recherche du couple de primers à partir de la séquence d'ARN messager

Le choix des primers est réalisé à l'aide du programme Primers express (Applied Biosystem) qui suggère des couples de primers possibles pour une séquence à amplifier donnée en respectant différentes contraintes. La longueur optimale du fragment à amplifier doit être comprise entre 50 et 150 pb, celle des primers varie entre 15 et 30 pb et leur contenu en C/G doit représenter 20 à 70 % de la séquence nucléotidique. Afin de minimiser l'hybridation entre primers, ceux-ci sont choisis avec au maximum deux C et/ou G dans les cinq derniers nucléotides de l'extrémité 3'. La difficulté essentielle de cette sélection réside dans la détermination du  $T_m$  des primers qui ne peuvent différer que de  $1^{\circ}\text{C}$  ou  $2^{\circ}\text{C}$  et qui doivent impérativement se situer entre  $58^{\circ}\text{C}$  et  $60^{\circ}\text{C}$ .

En effet, ce programme est conçu pour un protocole de PCR déterminé dont les paramètres sont fixés et ce, quelle que soit la condition expérimentale étudiée (figure 2.7). Pendant les premiers cycles de la réaction, la fluorescence reste en dessous du niveau de base (background). Le cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise le seuil de détection (défini comme étant l'intensité de fluorescence significativement plus élevée que le niveau de base) correspond au  $C_t$  (Cycle threshold). Ce dernier est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible généré après rétrotranscription et donc à l'abondance de l'ARNm présent dans l'échantillon (figure 2.8)

#### II.8.2.3 La reverse transcription (RT)

Comme la séquence du génome de la souris (et donc les limites introns/exons) n'est pas encore disponible dans les banques de données, les extraits d'ARN total ont été traités à la DNase RNase-free avant la RT. Ce traitement permet d'éliminer une contamination éventuelle et souvent observée des extraits d'ARN totaux par de l'ADN génomique. Pour ce traitement, 2  $\mu\text{l}$  de DNase I (Roche-Mannheim, Germany) sont ajoutés à 5  $\mu\text{g}$  d'ARN total dans un volume final de 7,5  $\mu\text{l}$ . Ce mélange est incubé 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$  puis 5 min à  $75^{\circ}\text{C}$  pour inhiber l'enzyme. L'ARN total est ensuite incubé pendant 10 min à  $70^{\circ}\text{C}$  avec 2  $\mu\text{l}$  d'oligo

dT<sub>(12-18)</sub> (500 ng/μl) (In Vitrogen, Pays-Bas) juste avant d'être déposé sur glace pendant 5 min. On ajoute alors 9 μl de mélange réactionnel (1X Buffer RT; DTT, 200 μl final ; RNAsin, 40U/μl; mix dNTP, 200 μl final; H<sub>2</sub>O) par test et 1,5 μl de Super Script II (reverse transcriptase, In Vitrogen, Pays-Bas) aux échantillons excepté dans les NAC (Non Amplification Control).

Les NAC sont donc des tests permettant de contrôler une éventuelle contamination par de l'ADN génomique. Pour réaliser la réaction de reverse transcription, les différents mélanges sont incubés pendant 90 min à 42°C suivies de 15 min à 70°C afin d'inhiber l'enzyme. Pour s'assurer que les échantillons ne contiennent que de l'ADNc, il est nécessaire de les incubés avec 2 U/μl de la RNase H (In Vitrogen, Pays-Bas) pendant 20 min à 37°C. Ils sont immédiatement congelés à -20°C.

#### II.8.2.4 Détermination de la concentration en primers

Afin de rechercher les concentrations optimales en primers, trois concentrations en primers R (Reverse) et F (Forward) sont testés (figure 2.9) et ce, pour chaque gène. Le but est de choisir celles qui ne génèrent pas d'amplification des NTC (No Template Control) et qui possèdent le plus bas Ct.

Les différentes concentrations sont mélangées au SYBR Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Pays-Bas) avec 5 μl d'H<sub>2</sub>O pour les NTC ou 5 μl d'ADNc pour les tests, dans un volume final de 25 μl.

#### II.8.2.5 Détermination de la courbe de dilutions

Cette courbe sert à montrer l'efficacité des PCR. En effet, les différentes concentrations en ADNc testées pour chaque gène permettront de déterminer une droite de régression correspondante (figure 2.10). La pente de ces droites (a) nous renseigne sur l'efficacité de la PCR. En effet, quand celle-ci est égale à -3,2, l'efficacité de la réaction équivaut à 100 % ( $E=10^{-1/\text{pente}}-1$ ). Pour que la comparaison des expressions des gènes étudiés soit possible, il est nécessaire que leur PCR ait la même efficacité.

#### II.8.2.6 Quantification de l'expression des gènes M-CPT1 et L-CPT1 et CPT2

Une PCR par RT est réalisée pour chaque gène dans les différentes conditions étudiées. Le SYBR Green PCR Master Mix et les primers R et F de concentration déterminée sont

ajoutés à 5  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O pour les NTC ou 5  $\mu$ l d'ADNc pour les tests dans un volume final de 25  $\mu$ l. Le mélange est ensuite placé dans le thermocycleur et l'amplification se produit pendant 2 h 15. Ce temps correspond à 40 cycles.

#### II.8.2.7 Analyse des résultats

L'interprétation commence par la détermination du Ct qui se fait par l'ajustement du seuil de détection dans la zone linéaire d'amplification. Ensuite, le  $\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct = Ct du gène d'intérêt – Ct de l'House Keeping Gene) de chaque gène pour chaque condition est évalué. On calcule ensuite pour chaque gène d'intérêt, un  $\Delta\Delta$ Ct ( $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct du gène d'intérêt –  $\Delta$ Ct du gène d'intérêt présent dans les cellules contrôles). On détermine enfin la quantité relative d'expression du gène étudié dans les différentes conditions en utilisant la formule  $Q_r = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Une quantité relative de 1 signifie que le gène cible ne montre aucune variation d'expression dans la condition expérimentale testée.

### ***II.9 Mesure de l'incorporation de glycérol tritié ( $[^3H]$ -glycérol) et d'oléate marqué au carbone-14 ( $[^{14}C]$ -oléate)***

Cette technique nous a permis de mesurer les flux d'acides gras et de glycérol incorporés dans les cellules 3T3-L1 incubées ou non en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou en présence des inhibiteurs de l'activité mitochondriale (AA 10nM, FCCP 1 $\mu$ M).

#### ***II.9.1 Principe***

On peut quantifier l'incorporation et le devenir des acides gras et de glycérol dans les cellules soumises à différentes stimulations grâce à des traceurs radioactifs comme le  $[^{14}C]$ -oléate et le  $[^3H]$ -glycérol. La radioactivité associée à la population cellulaire est le reflet de la mesure de l'incorporation de ces molécules dans la cellule



### *II.9.2 Méthode*

Les cellules 3T3-L1 sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 12 puits (Corning, USA). Trois jours plus tard, elles sont incubées dans du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3), l'antimycine A (10 nM) ou le FCCP (1  $\mu$ M) pendant des temps croissants allant de 1 à 8 jours. Les cellules sont ensuite rincées avec 1,5 ml de PBS contenant 0,5 % de BSA et incubées pendant 90 min ou 180 min à 37 °C en présence d'[<sup>14</sup>C]-oléate (50 mCi/mmol) et de [<sup>3</sup>H]-glycérol (200 mCi/mmol) dilués dans du DHG-L1 sans sérum contenant 0,5 % de BSA. Au terme de ces incubations, les cellules sont rincées 2 fois avec 1ml de PBS contenant 0,5 % de BSA et la suite du protocole est identique à celui décrit pour l'incorporation de glucose.

### *II.10 Transfection et système rapporteur luciférase*

Par cette technique, nous avons cherché à mettre en évidence l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription SREBP1 dans des cellules 3T3-L1 incubées en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou en présence d'antimycine A (10 nM).

#### *II.10.1 Principe*

Cette technique nécessitant une transfection permet notamment de tester l'effet d'un traitement sur l'activation du gène rapporteur luciférase dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur authentique ou synthétique. Dans ce travail, nous avons utilisé le promoteur authentique du récepteur aux LDL contenant une séquence consensus reconnue par SREBP1. Cette construction nous a été généreusement donnée par le professeur P.A. Edwards (UCLA, USA). Le système contient un site SRE (Sterol Responsive Element) flanqué de 2 sites Sp1. Un schéma reprenant la structure de ce promoteur est illustré à la figure 2.11. Parce que l'efficacité de transfection peut être variable d'un puits à l'autre, les cellules sont co-transfectées avec un plasmide contenant le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase et sous le contrôle d'un promoteur viral fort de type CMV (CytoMégaloVirus). L'activité de la luciférase, exprimée en RLU (Relative Light Units) est donc rapportée à l'activité  $\beta$ -

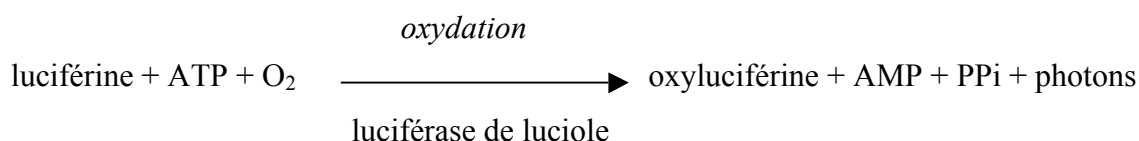
galactosidase (exprimée en unités de densité optique) afin de normaliser les résultats et de se rendre compte du taux de transfection dans les différents tests.

#### II.10.1.1 Transfection des 3T3-L1 par le Superfect Transfection Reagent (Qiagen)

Cet agent de transfection est un dendrimère activé structuré par un corps central sphérique auquel sont associées des expansions dont les extrémités libres amino-terminales sont chargées positivement. Par affinité électrostatique, l'ADN vient se fixer à ces expansions formant ainsi un complexe compact capable d'entrer dans la cellule. En effet, les complexes Superfect-ADN possèdent une charge nette positive et sont donc capables de se lier aux glycoprotéines eucaryotiques chargées négativement. Les mécanismes de pénétration de l'ADN dans la cellule et les voies de son trafic intracellulaire sont encore peu connus. Il apparaît cependant que la liaison à la surface de la membrane plasmique active le processus d'endocytose et ainsi la pénétration du complexe dans le cytoplasme. Le transport de l'ADN vers le noyau est enfin permis par l'action du complexe qui empêche l'activation des nucléases lysosomiales en tamponnant le pH de l'organite (SuperFect Transfection Reagent, Handbook, Qiagen).

#### II.10.1.2 Dosage des activités luciférase et $\beta$ -galactosidase

Lorsque le facteur de transcription d'intérêt se lie au promoteur du gène codant pour la luciférase de luciole, l'enzyme est transcrite et son activité peut être mesurée par la détection de la lumière produite au cours de la réaction suivante :



L'activité de cette enzyme est dosée grâce au kit "Luciferase Reporter Assay System" (Promega, USA) et l'émission de photons est mesurée au moyen d'un bioluminomètre.

Inséré dans un plasmide d'expression, le gène procaryotique (Lac Z) codant la  $\beta$ -galactosidase est constitutivement exprimé sous le contrôle du promoteur fort CMV. L'expression de la  $\beta$ -galactosidase est donc indépendante de la condition expérimentale et

n'est fonction que du taux de transfection. C'est pour ces raisons que cette construction est utilisée pour la normalisation des résultats.

L'activité  $\beta$ -galactosidase est dosée par un test colorimétrique. Un aliquot de l'échantillon est ajouté à une solution réactionnelle contenant le substrat de l'enzyme : ONPG (O-nitrophényl-galactopyranoside) (Promega, USA). Le substrat chromogène est alors clivé par l'enzyme et le produit généré présente un pic d'absorbance maximal à 405 nm.

## *II.10.2 Méthode*

### II.10.2.1 Sous-culture

La veille de l'expérience, les cellules 3T3-L1 sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 12 puits (Corning, USA) dans du milieu DHG contenant 10 % de SVF.

### II.10.2.2 Transfection

Les cellules sont co-transfectées avec 1  $\mu$ g d'ADN total par puits et qui se répartit comme suit : 0,5  $\mu$ g de plasmide contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur authentique du récepteur aux LDL, 0,25  $\mu$ g du plasmide rapporteur contenant le gène codant la  $\beta$ -galactosidase et 0,25  $\mu$ g de plasmide vecteur contrôle PGL2 ou d'un plasmide codant pour la forme sauvage exogène de SREBP1. Par puits, on dilue les plasmides dans 75  $\mu$ l de DHG sans sérum, auxquels on ajoute 5  $\mu$ l d'agent Superfect (rapport 1 : 5) avant de mélanger pendant 10 s au vortex (<1000 rpm). Une incubation de 20 min est nécessaire à la formation des complexes Superfect-ADN. On ajoute ensuite 400  $\mu$ l/puits de DHG contenant 10 % de SVF et 450  $\mu$ l de ce mélange sont déposés sur les cellules. Après une incubation de 6 h à 37°C, le milieu de transfection est remplacé par le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou par du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant l'antimycine A (10nM). Les cellules sont alors incubées pendant 24 et 48 h avant les dosages. Pour le temps correspondant à 6 h d'incubation, le milieu de transfection est remplacé par du DHG + 10 % de SVF. Le lendemain, les molécules sont ajoutées pendant 6 h avant les dosages.

### II.10.2.3 Dosages

#### *II.10.2.3.a Lyse cellulaire*

Les cellules sont rincées avec 1,5 ml de PBS puis lysées à température ambiante dans 150 µl de tampon de lyse « Passive Lysis Buffer » (Promega, USA) pendant 15 min sous agitation. Les lysats sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne). Les dosages des activités luciférase et  $\beta$ -galactosidase sont réalisés sur des aliquots du surnageant.

#### *II.10.2.3.b Dosage de la luciférase*

Le LAR (Luciferase Assay Reagent) contenant la mixture réactionnelle pour le dosage de l'activité luciférase est préparé et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  selon les instructions du kit «Luciferase Reporter Assay System » (Promega, USA). On ajoute 20 µl d'échantillon à 100 µl de LAR et l'on mesure la production de photons par une lecture au bioluminomètre (Biocounter M 2010, Lumac, Pays-Bas).

#### *II.10.2.3.c Dosage de la $\beta$ -galactosidase*

Ce dosage colorimétrique est réalisé dans une plaque de 96 puits (Corning, USA). On dépose 40 µl d'échantillon ou de tampon de lyse (blanc) dans les puits auxquels on ajoute 40 µl de tampon de réaction contenant le substrat de la  $\beta$ -galactosidase dont la composition est la suivante pour 50 ml:  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  200 mM; pH 7,3, 50 µl de  $\text{MgCl}_2$  2 M ; 350 µl de 2-mercapto-éthanol et 66,5 mg d'ONPG (O-nitrophénylgalactopyranoside, Sigma, USA). Après incubation de 30 à 120 min (fonction de l'efficacité de transfection) à  $37^{\circ}\text{C}$ , on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à 405 nm (Ultramarck, Biorad, Allemagne).

Les résultats obtenus en normalisant l'activité luciférase par l'activité  $\beta$ -galactosidase (RLU/D.O.  $\beta$ -gal) sont exprimés arbitrairement en nombre de fois d'augmentation du contrôle et représentent la moyenne pour 2 valeurs ( $n=2$ ).

### ***II.11 Mesure de la $\beta$ -oxydation des acides gras dans des cellules 3T3-L1***

Par ce test, nous avons pu estimer et comparer la  $\beta$ -oxydation d'acides gras dans des cellules 3T3-L1 incubées ou non en présence du cocktail inducteur de la différenciation (MIX

3) ou en présence d'inhibiteurs des phosphorylations oxydatives mitochondriales (AA 10 nM, FCCP 1  $\mu$ M).

### *II.11.1 Principe*

Le taux de  $\beta$ -oxydation des acides gras dans une cellule peut varier selon la condition dans laquelle elle se trouve. Lorsqu'un acide gras pénètre dans la cellule où est mobilisé à partir des TAG, celui-ci peut généralement être mis ou remis en réserve sous forme de TAG, être le précurseur de divers composés lipidiques ou encore subir la  $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale. Parce que cette  $\beta$ -oxydation s'accompagne d'une libération de dioxyde de carbone à chaque cycle (point I.4.5), il est possible de mesurer la quantité de carbone généré sous cette forme en utilisant un acide gras précurseur métabolisable tel que le [ $^{14}$ C]-oléate dont un atome de carbone est marqué par l'isotope radioactif [ $^{14}$ C]. Ce test se base sur le comptage de la radioactivité associée au  $\text{CO}_2$  qui se retrouve sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$  libéré par la cellule, dégazé dans le milieu de culture et capturé par un filtre.

### *II.11.2 Méthode*

#### II.11.2.1 Sous-cultures et incubations

Les cellules 3T3-L1 sont repiquées à 50 % de confluence dans des plaques de 12 puits (Corning, USA) dans du DHG contenant 10 % de SVF. Trois jours plus tard, elles sont incubées dans du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3), l'antimycine A (10 nM) ou le FCCP (1  $\mu$ M), pendant 4 ou 8 jours. Le jour du test et dans certaines conditions, les cellules sont pré-incubées ou non pendant 3 h en présence d'AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide riboside) à 500  $\mu$ M (Toronto Research Chemicals, Canada). Elles sont ensuite rincées avec 1,5 ml de PBS contenant 0,5 % de BSA (Sigma, USA) puis incubées pendant 90 ou 180 min pour la réalisation de la cinétique, ou pendant 90 min en présence de 0,5 ml de DHG-L1 sans sérum contenant de la DL-carnitine (1mM) (Sigma, USA), 0,5 % de BSA, [ $^{14}$ C]-oléate (50 mCi/mmol) à 1  $\mu$ Ci/ml avec ou sans 500  $\mu$ M d'AICAR. Etant donné que le carbone marqué généré se retrouve sous la forme soluble  $\text{HCO}_3^-$ , une étape de dégazage est nécessaire pour récupérer cet isotope sous la forme de  $^{14}\text{CO}_2$ . Le milieu d'incubation de la population cellulaire correspondante est

recupéré dans une nouvelle boîte de 12 puits. A ces milieux, on ajoute ensuite 100 µl d'acide perchlorique à 70 % permettant ainsi la libération de  $^{14}\text{CO}_2$  par la réaction suivante :



Les puits sont ensuite recouverts par un filtre 3 V (Whatman, Grande-Bretagne) saturé en NaOH (2N) et par un système étanche obtenu par la compression de ce filtre par un mousse placé en dessous du couvercle de la boîte. Celui-ci est surmonté par une masse. Ce montage est placé pendant 60 min à 37°C sous agitation et suivi d'un séchage de ces filtres pendant 30 min à 37°C. Ceux-ci sont enfin découpés et chaque disque contenant la surface d'un puits est placé dans une fiole de comptage à laquelle on ajoute 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). Le comptage de la radioactivité est réalisé dans un compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, USA). Des blancs sont également réalisés en mesurant la quantité de radioactivité contaminante retrouvée sur les filtres et libérée à partir du milieu d'incubation utilisé sans conditionnement cellulaire. Un comptage de la radioactivité associée aux tapis cellulaire qui reflète l'incorporation de l'acide gras dans la cellule, est également réalisé selon le protocole décrit au point II.9.2. Les résultats sont calculés en (cpm  $^{14}\text{CO}_2$  / cpm associés aux tapis cellulaires suite à l'incorporation de [ $^{14}\text{C}$ ]-oléate) et rapportés aux quantités de protéines. Ils représentent la moyenne  $\pm$  un écart-type pour 3 valeurs (n=3).

## II.12 Dosage de l'activité de l'enzyme CPT1

Par cette technique, nous avons mesuré l'activité de l'isoforme CPT1 à partir de préparations cellulaires enrichies en mitochondries réalisées à partir de cellules 3T3-L1 préalablement incubées avec le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3) ou avec l'inhibiteur de l'activité mitochondriale (AA, 10 nM)). Nous avons ensuite mesuré l'activité de cette enzyme selon la méthode décrite par Esser *et al.* (1996) et Brown *et al.* (1997) (Esser *et al.*, 1996) (Brown *et al.*, 1997) (Brown *et al.*, 1997)..

Un test de mise au point a été réalisé sur les cellules L929, cellules de fibrosarcome murin, dans le but de réaliser des tests de mise au point comme déterminer la quantité de protéines mitochondriales à utiliser pour les expériences suivantes sur les 3T3-L1.

### *II.12.1 Préparation des extraits cellulaires enrichis en mitochondries*

#### II.12.1.1 Principe

On peut isoler un organe comme la mitochondrie à partir d'homogénats cellulaires par la technique de centrifugation différentielle, qui repose sur le principe que les particules de densité différente sédimentent à des vitesses différentes quand elles sont soumises à une force centrifuge.

#### II.12.1.2 Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> à 50 % de confluence. Trois jours plus tard, les 3T3-L1 sont incubées dans du DHG-L1 + 10 % de SVF contenant l'antimycine A (10 nM). Après 8 jours d'incubation, les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS, puis raclées dans du tampon Tris-KCl (Tris 5 mM, KCl 150 mM) en ajustant le volume final à 5 ml. Les populations cellulaires sont centrifugées 2 min à 1200 g et à 4°C. Le culot de chaque condition est récupérée dans 0,5 ml de tampon Tris-KCl et les cellules sont homogénéisées par rupture mécanique à l'aide de l'homogénéisateur « Dounce Tight ». Les homogénats obtenus sont poolés par condition de traitement et sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 8000 g et à 4°C. Les préparations mitochondriales sont resuspendues dans 500 µl de tampon Tris-KCl et les aliquots de 100 µl et serviront au dosage enzymatique.

### *II.12.2 Mesure de l'activité enzymatique de la CPT1*

#### II.12.2.1 Principe

L'importance d'une voie métabolique est fonction de la quantité de substrat mais également de l'activité des enzymes qui y participent. Les acides gras présents dans une cellule peuvent suivre différentes voies métaboliques dont celle de la  $\beta$ -oxydation. Pour participer à cette métabolisation, les acides gras activés sous forme d'acyl-CoA sont transestérifiés sur la carnitine et ainsi transportés dans l'espace intermembranaire mitochondrial grâce à la CPT1. Par l'utilisation d'un substrat tel que le palmitoyl-CoA et de la carnitine marquée au carbone-14 [<sup>14</sup>C] comme traceur radioactif, il est possible de mesurer

la quantité d'acide gras transestérifiée sur la carnitine marquée au sein de la mitochondrie. Après une extraction dans un solvant organique, le comptage de la radioactivité associée au palmitoyl-carnitine permet de déterminer l'activité de l'enzyme CPT1.

#### II.12.2.2 Méthode

Aux 100  $\mu$ l d'extrait cellulaire enrichis en mitochondries correspondant à 200  $\mu$ g de protéines, on ajoute 400  $\mu$ l de mixture réactionnelle (BSA 1 %, tampon Tris-KCl (\*); pH 7,2, ATP 4 mM, GSH 0,25 mM, DL-carnitine 1 mM, palmitoyl-CoA 50  $\mu$ M, roténone 0,125 mM, H<sub>2</sub>O, [<sup>14</sup>C]-carnitine 30,50 mCi/mmmole) contenant ou non du malonyl-CoA (100  $\mu$ M). La réaction de transestérification catalysée par la CPT1 est réalisée pendant 10 min à 30°C. Après incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 500  $\mu$ l d'HCl (1,2N) et l'extraction organique débute par l'addition de 500  $\mu$ l de butanol. Cette étape permet la solubilisation des acides gras transestérifiés. Après avoir vortexé 10 s, les échantillons sont centrifugés pendant 1 min à 8000 rpm et 300  $\mu$ l de la phase organique (supérieure) sont placés dans un nouvel eppendorf. L'extraction de la [<sup>14</sup>C]-carnitine contaminante est réalisée en ajoutant 60  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O. Après avoir vortexé 10 s, les échantillons sont centrifugés pendant 1 min à 8000 rpm afin d'éliminer toute trace d'élément hydrophile. Un comptage de la radioactivité est réalisé sur un aliquot de 250  $\mu$ l de la phase contenant le substrat organique, placés dans une fiole de comptage et dilués dans 5 ml de liquide scintillant pour le comptage de la radioactivité dans un compteur à scintillations. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) et représentent la moyenne  $\pm$  un écart-type pour 3 valeurs (n=3).

#### *II.13 Analyse statistique des résultats.*

Sauf explicitation précise dans le texte, les résultats représentent la moyenne  $\pm$  un écart-type pour trois réplicats (n = 3). Les différences statistiquement significatives ont été calculées par une analyse de variance I (Anova I), suivi de contrastes de scheffé et sont annotées par \* (pour une augmentation) ou ° (pour une diminution) pour  $p < 0,05$  ; \*\* ou °° pour  $p < 0,01$  et \*\*\* ou °°° pour  $p < 0,001$ .

\*Tampon Tris-KCl : Tris 0,525 M, pH 7,2, KCl 75 mM, KCN 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM



### ***III Résultats et discussion***

Dans notre travail visant à mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'accumulation de TAG dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire, nous utiliserons l'antimycine A (AA), un inhibiteur du complexe III. De plus, nous nous intéresserons à un autre inhibiteur des phosphorylations oxydatives, le FCCP qui est un protonophore dissipant le potentiel de membrane mitochondrial. Le FCCP, contrairement à l'antimycine A, n'induit pas ce phénotype d'accumulation de TAG dans la cellule. Enfin, dans chaque expérience, nous comparerons les résultats obtenus pour les cellules incubées en présence d'inhibiteurs des phosphorylations oxydatives à ceux obtenus au cours d'un programme de différenciation classique induit par l'incubation des cellules en présence d'un cocktail inducteur de la différenciation de référence (Student *et al.*, 1980).

Dans des expériences antérieures à ce travail, il a été montré au laboratoire que des cellules 3T3-L1 soumises à un stress énergétique suite à l'inhibition de l'activité mitochondriale par l'antimycine A, l'oligomycine et la stigmatelline accumulent des TAG. Par contre, le FCCP n'induit pas l'apparition du phénotype "adipocyte-like". Etant donné que ces inhibiteurs de l'activité mitochondriale utilisés agissent sur des cibles moléculaires différentes, les conséquences métaboliques pour la cellule sont probablement différentes.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 sont couramment utilisés pour étudier le processus d'adipogenèse, étant donné que leur différenciation en adipocytes matures peut-être induite *in vitro* par un cocktail inducteur de la différenciation, composé des 3 classes de molécules suivantes : l'insuline, des molécules capables d'augmenter le contenu intracellulaire en AMPc et des glucocorticoïdes (Student *et al.*, 1980). Cependant, le taux de différenciation de ces cellules en adipocytes décroît avec le nombre de passages en culture. Ceci a précédemment été montré au laboratoire par une expérience d'induction de la différenciation et de quantification de l'accumulation de TAG par un test de coloration à l'Oil Red O. Ces tests ont été réalisés sur des cellules à différentes générations allant de la génération 8 à 40. Dans ces conditions, nous observons une diminution de l'efficacité de différenciation d'environ 55 % entre des cellules différenciées en génération 8 ou 18. De plus, les cellules contrôles prolifèrent plus rapidement et se différencient également spontanément à partir de la génération 18 (S. Vankoningskloo, communication personnelle). Nous avons donc décidé

d'utiliser dans l'ensemble des expériences de ce travail, des cellules dont le nombre de passages en culture est inférieur ou égal à 15.

Dans le but de se familiariser avec la culture cellulaire, de maîtriser et de reproduire un programme de différenciation classique, nous commençons la présentation de nos résultats par un test comparant les effets phénotypiques de l'antimycine A et du FCCP sur l'accumulation de vésicules de TAG. La détection de vésicules de TAG est réalisée par une coloration à l'Oil Red O.

### ***III.1 Mise en évidence du phénotype adipocytaire et "adipocyte-like"***

L'étude des conséquences phénotypiques des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives commence par la quantification et la visualisation de TAG dans les 3T3-L1 et leur comparaison au modèle de différenciation standard.

La figure 3.1 (A) montre la quantification de l'accumulation de TAG au cours de la différenciation des 3T3-L1 (G11) incubées ou non (contrôles, CTL) en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3. Une coloration à l'Oil Red O est effectuée après 1, 2, 3, 4, 7 et 8 jours d'incubation. Les cellules sont rincées, fixées et colorées avant la visualisation au microscope à contraste de phase et la quantification au spectrophotomètre. On constate que la quantité de TAG augmente progressivement au cours du temps. La micrographie 3.1C (b) permet la visualisation du phénotype adipocytaire, caractérisé par la formation de vésicules de TAG provoquant une hypertrophie et un arrondissement de la cellule. La figure 3.1B présente les résultats de l'accumulation de TAG dans des 3T3-L1 soumises à une incubation de plusieurs jours en présence d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1  $\mu$ M). On remarque que l'incubation des cellules en présence d'antimycine A permet également d'induire l'accumulation de TAG, contenus dans de nombreuses vésicules et ce, particulièrement pour 8 jours de traitement (figure 3.1B). Néanmoins, ces vésicules sont beaucoup plus petites que les vésicules observables dans les cellules dont la différenciation est induite par le MIX 3. Ce qui correspond en termes de quantification, à une diminution de  $\pm 60\%$ . Les aspects quantitatifs et phénotypiques sont également très différents. Les cellules traitées à l'antimycine A adoptent une morphologie allongée et effilée que nous appelons « adipocyte-like » en raison de l'accumulation de TAG et qui est visualisé sur la micrographie 3.1C (d). Par contre, l'incubation des cellules en présence de FCCP n'a aucun effet sur

l'accumulation de TAG dans ces cellules. Ces cellules conservent une morphologie comparable aux cellules contrôles (figures 3.1.C (a) et C (c)).

Dans cette première expérience, nous avons appris à maîtriser la culture de cellules permettant d'induire le programme de différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1. Nous avons également reproduit et confirmé les effets respectifs de 2 inhibiteurs des phosphorylations oxydatives mitochondriales, l'antimycine A et le FCCP sur l'accumulation de TAG dans des 3T3-L1 quantifiée par une méthode de coloration à l'Oil Red O.

Nous pouvons donc conclure que l'antimycine A mais pas le FCCP, est capable d'induire un phénotype « adipocyte-like » caractérisé par l'accumulation de TAG par des cellules 3T3-L1 mais qui est toutefois très différent quantitativement et qualitativement du phénotype induit par le cocktail inducteur. Dans la suite de notre travail, nous allons donc rechercher et comparer les mécanismes impliqués dans l'accumulation de TAG dans les cellules 3T3-L1. Nous chercherons également à mieux comprendre les raisons de ces différences phénotypiques.

De manière intéressante, nous devons mentionner qu'une étude récemment publiée par Huss *et al.* et réalisée sur des cardiomyocytes (*in vitro*) incubés en hypoxie montrent que ces cellules adoptent un phénotype très comparable aux 3T3-L1 dont l'activité mitochondriale est inhibée par l'antimycine A (Huss *et al.*, 2001). Cette étude suggère que l'accumulation de TAG qui est encore augmentée par la présence d'acide oléique dans le milieu consiste en une réponse métabolique adaptative face à une déplétion intracellulaire en ATP. En effet, ils montrent que les cardiomyocytes sous hypoxie préservent leur capacité de produire de l'énergie, en favorisant la voie catabolique de la glycolyse plutôt que celle de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Huss *et al.*, 2001). C'est par la diminution d'expression de la M-CPT1 au niveau transcriptionnelle; qui pour rappel, permet l'entrée des acides gras dans la mitochondrie ; que ces auteurs expliquent l'accumulation de TAG dans les cardiomyocytes en hypoxie.

Rappelons qu'un des objectifs principaux de ce travail est d'étudier de manière comparative, les mécanismes conduisant à l'accumulation de TAG par les 3T3-L1, au cours d'un programme de différenciation ou lors d'un traitement par l'antimycine A. On peut émettre 2 grandes hypothèses : soit les cascades de signalisation et les mécanismes impliqués sont similaires au début des deux traitements mais que le programme initié par l'antimycine A

est inhibé à un moment donné; soit les mécanismes sont totalement différents. Dans la première hypothèse, l'acquisition du phénotype "adipocyte-like" par les cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A peut être vu comme un programme de différenciation incomplet. Nous allons maintenant nous intéresser à l'effet du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3, de l'antimycine A et du FCCP sur une des étapes précoces, importante et caractéristique de l'adipogenèse: l'expansion mitotique clonale (MacDougald *et al.*, 1995). Cette étape est en effet considérée comme un mécanisme nécessaire à la différenciation maximale des pré-adipocytes. Nous allons donc rechercher l'effet de nos différents traitements sur la prolifération cellulaire par la mesure de la quantité de thymidine tritiée incorporée dans l'ADN des 3T3-L1.

### ***III.2 Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ( $[^3\text{H}]$ -thymidine) par les cellules en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial***

Il est bien décrit dans la littérature que les pré-adipocytes passent par une étape précoce d'expansion mitotique clonale lors du processus d'adipogenèse qui fait suite à l'inhibition de contact lorsque les cellules arrivent à confluence (MacDougald *et al.*, 1995). Afin de mieux caractériser notre modèle, nous avons cherché à savoir si les cellules soumises à une inhibition de l'activité mitochondriale s'engageaient également dans un cycle de reprise de prolifération caractéristique dans l'adipogenèse. Pour cela, nous avons utilisé un test d'incorporation de  $[^3\text{H}]$ -thymidine permettant d'estimer l'importance de la phase S (synthèse d'ADN) dans des 3T3-L1 incubées en présence du cocktail pro-différenciateur, en présence d'antimycine A ou de FCCP. Rappelons aussi que certains auteurs suggèrent que cette synthèse d'ADN au cours de la phase S est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de facteurs de transcription gérant l'expression de protéines qui participent à la synthèse des TAG tel que la FAS (Tang *et al.*, 1999).

La figure 3.2 présente les résultats obtenus pour l'incorporation de  $[^3\text{H}]$ -thymidine dans les différents traitements. Des 3T3-L1 (G11) sont incubées ou non (contrôles, CTL) en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3, en présence d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1  $\mu\text{M}$ ). Pour le test d'incorporation de  $[^3\text{H}]$ -thymidine effectué après 5 h, 2, 4 et 8 jours de traitement dans les différentes conditions, les cellules sont incubées pendant 4 h en présence de  $[^3\text{H}]$ -thymidine (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Elles sont ensuite rincées, lysées et un aliquot est récupéré pour le comptage de la radioactivité.

On constate que les cellules contrôles, qui correspondent à l'incubation de cellules en présence de DHG-L1 + 10 % de SVF diminuent l'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine au cours du temps. Cependant, l'incorporation relativement élevée de [ $^3$ H]-thymidine au jour 0 de cellules à confluence qui devraient répondre à une inhibition de contact, peut probablement s'expliquer par un état de sous-confluence lors du premier test au jour 0. On constate également que l'incubation en présence du MIX 3 stimule l'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine dans les cellules après 2, 4 et 8 jours de traitement. De manière surprenante, l'antimycine A induit très précocement une phase d'incorporation active de [ $^3$ H]-thymidine dans des cellules incubées pendant 2 jours en présence de cet inhibiteur. Ce phénomène n'est pas observé pour les cellules incubées en présence de FCCP.

En effet, le profil d'incorporation observé en présence de la molécule découplante est comparable à celui de cellules contrôles. Il est assez surprenant que l'antimycine A induise une reprise de la prolifération cellulaire, alors qu'elle provoque une déplétion en ATP. En effet, les processus qui interviennent dans la synthèse d'ADN nécessitent une importante quantité d'ATP. On pourrait donc penser que la réserve énergétique, des 3T3-L1 subissant un stress énergétique, n'est plus suffisante pour assurer la réplication du génome. Cependant, il a été rapporté que les pré-adipocytes soumis aux molécules pro-adipogènes subissent également une déplétion en ATP, ce qui n'empêche pas d'entamer une nouvelle phase d'expansion mitotique clonale. En fait, il a été montré que c'est un composant du cocktail inducteur de la différenciation, la dexaméthasone qui est responsable de cette diminution d'ATP, en agissant au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Morin *et al.*, 2000).

Nous avons donc comparé nos modèles d'étude sur le plan de la prolifération cellulaire au cours des différents traitements et nous avons confirmé que les cellules traitées en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3 passent par une reprise de la division cellulaire, caractérisée par une synthèse d'ADN durant les premiers jours du programme de différenciation. L'antimycine A semble également induire, de manière transitoire (J2), une reprise des divisions cellulaires visualisée par l'augmentation d'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine.

A ces résultats s'ajoute un argument qui supporte que des cellules 3T3-L1 traitées avec l'antimycine A passent par une nouvelle phase de divisions cellulaires. En effet, il a été montré au laboratoire par la technique du Western blotting, que la phosphorylation des protéines p42 et p44 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est transitoirement (endéans les 24 h) plus élevée dans des cellules incubées en présence d'antimycine A. Or ces MAPK

sont souvent décrites pour favoriser le cycle cellulaire et sont responsables de l'effet de nombreux facteurs de croissance et mitogènes sur le cycle cellulaire.

L'importance de cette étape de reprise de prolifération cellulaire dans le processus d'adipogenèse est actuellement débattue. Certains auteurs montrent que cette phase d'expansion clonale, associée à l'hyperphosphorylation de la pRB (Retinoblastoma protein) et à l'activation de certains facteurs de transcription tel que c-fos par les voies des p42/p44 MAPK, des PKC et de la PI3-kinase, est nécessaire à la conversion de pré-adipocytes en adipocytes (Usui *et al.*, 2000) (Hansen *et al.*, 2002) (Inuzuka *et al.*, 1999). Par contre, d'autres études montrent que cette phase mitotique clonale n'est pas nécessaire, puisque l'inhibition de la voie des MAPK par le PD 98059 empêche les divisions cellulaires mais n'affecte pas la différenciation des 3T3-L1 (Qiu *et al.*, 2001).

Afin de poursuivre notre recherche sur la manière les dont les TAG s'accumulent dans nos modèles cellulaires, nous avons décidé de diriger notre étude sur les précurseurs de ces TAG, que sont les acides gras et le glycérol. En sachant que les pré-adipocytes demandent une quantité importante de ces précurseurs pour se différencier, nous avons choisi de mesurer l'incorporation d'acides gras et de glycérol par des cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A ou de FCCP (Grimaldi *et al.*, 1997).

### ***III.3 Mesure de l'incorporation d'acides gras et de glycérol par les cellules en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial***

Nous avons quantifié l'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-glycérol et d' [ $^{14}\text{C}$ ]-oléate par des 3T3-L1 en différenciation ou incubées en présence d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1  $\mu\text{M}$ ), selon une méthode décrite dans la littérature par Muoio *et al.* (1999). Cependant, des expériences préliminaires ont été nécessaires dans le but de rechercher et d'adapter les conditions optimales du protocole d'incorporation d'acides gras et de glycérol à nos conditions expérimentales (Muoio *et al.*, 1999).

Dans une première expérience, nous avons réalisé une cinétique d'incorporation des 2 traceurs par des cellules 3T3-L1 (G10), pré-incubées pendant 2 jours en présence du MIX 3, pendant des temps croissants allant de 15 à 300 min. La figure 3.3 montre les résultats obtenus pour l'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-glycérol (A) et d' [ $^{14}\text{C}$ ]-oléate (B). Les cellules sont incubées pendant des temps de 15, 60, 90, 180 et 300 min en présence de 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-

glycérol et d'[\$^{14}\$C]-oléate dilués dans du DHG-L1 sans sérum contenant 0,5 % de BSA. Les cellules sont ensuite rincées, lysées et un aliquot est récupéré pour le comptage de la radioactivité.

On observe que l'incorporation de ces 2 molécules augmente progressivement au cours du temps et ce, tant pour les contrôles, qui correspondent à l'incubation des cellules en présence de DHG-L1 + 10 % de SVF, que pour les cellules préalablement incubées pendant 2 jours en présence du MIX 3. Nous avons décidé de choisir un temps d'incubation de 90 min, bien que l'on observe une incorporation plus importante après 5 h d'incubation et sans aucune cytotoxicité. Ce choix s'est fait sur base de 2 critères : l'incorporation suffisante des traceurs et la gestion du temps d'expérimentation. De plus, ce temps de 90 min est en accord avec des données d'incorporation d'acides gras et de glycérol, rapportées dans la littérature, qui utilisent des temps d'incubation compris entre 1 et 3 h (Muoio *et al.*, 1999). Dans l'expérience suivante, nous allons comparer l'incorporation d'acides gras et de glycérol dans des 3T3-L1 dans nos différentes conditions expérimentales au cours de 8 jours de traitement.

Nous avons donc mesuré la quantité de [\$^3\$H]-glycérol et d'[\$^{14}\$C]-oléate incorporée par des 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, CTL) en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3, en présence d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1 \$\mu\$M). La figure 3.4 présente les résultats obtenus pour des tests d'incorporation de [\$^3\$H]-glycérol (A) et d'[\$^{14}\$C]-oléate (B) par des 3T3-L1 (G12) réalisés après 5 h, 1, 2, 3, 4 et 8 jours d'incubation. Les cellules sont incubées pendant 90 min en présence des traceurs radioactifs (1 \$\mu\$Ci/ml) dilués dans du DHG-L1 sans sérum contenant 0,5 % de BSA. Les cellules sont ensuite rincées, lysées et la radioactivité associée est comptée sur un aliquot au compteur à scintillations. On constate tout d'abord que l'incorporation par des cellules contrôles, des 2 traceurs est relativement stable au cours du temps. On observe ensuite que pendant les 2 premiers jours d'incubation, les incorporations de glycérol et d'acide oléique par les cellules incubées en présence de MIX 3 ne sont pas différentes des contrôles. Ces résultats confirment les résultats obtenus dans l'expérience de cinétique d'incorporation réalisée sur des cellules incubées en présence du MIX 3 pendant 48 h (figure 3.3). Par contre, au troisième jour du programme de différenciation, on observe une augmentation d'incorporation des 2 traceurs qui est statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) par rapport aux contrôles.

D'autre part et de manière intéressante, on observe qu'au cours des 8 jours de programme, l'incubation en présence d'antimycine A présente une diminution d'incorporation de [\$^3\$H]-glycérol qui est statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) par rapport aux contrôles. L'incorporation d'[\$^{14}\$C]-oléate n'est pas modifiée.

Ajoutons enfin que les profils d'incorporation des 2 traceurs par des 3T3-L1 incubées en présence de FCCP sont comparables aux profils obtenus pour les cellules contrôles.

En conclusion, la mesure d'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-glycérol et d'[\$^{14}\text{C}\$]-oléate nous permet de dire que, contrairement aux pré-adipocytes dont la différenciation est induite par le MIX 3, les pré-adipocytes incubées en présence d'antimycine A ou de FCCP incorporent peu de glycérol et d'acide oléique.

Une fois entrés dans la cellule, les acides gras à longue chaîne tel que l'oléate peuvent être convertis en acyl-CoA. Ils sont soit estérifiés principalement sous forme de TAG, soit utilisés dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, dans le but de produire de l'énergie (Thumelin *et al.*, 1999). Nous allons donc maintenant nous intéresser à la quantification de la  $\beta$ -oxydation des acides gras incorporés par des cellules 3T3-L1 dans nos différents modèles.

### ***III.4 Mesure de la $\beta$ -oxydation des acides gras incorporés par les 3T3-L1 en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial***

Ce test consiste en la récupération de l'isotope  $^{14}\text{C}$  sous la forme de  $^{14}\text{CO}_2$  généré lors de la  $\beta$ -oxydation d'un traceur dont un des carbones est marqué, l'[\$^{14}\text{C}\$]-oléate et qui est préalablement incorporé par la cellule. Cette technique nous a donc permis de quantifier la  $\beta$ -oxydation dans des cellules 3T3-L1.

Nous avons tout d'abord réalisé une expérience de mise au point de la quantification de la  $\beta$ -oxydation dans des cellules 3T3-L1 (G13) traitées ou non (contrôles, CTL) pendant 4 jours en présence des molécules pro-adipogènes MIX 3. Nous avons également comparé l'importance de la  $\beta$ -oxydation dans des cellules incubées ou non en présence d'AICAR (500  $\mu\text{M}$ ). Rappelons que l'AICAR est un activateur synthétique de l'AMPK qui pénètre dans la cellule et active l'AMPK après phosphorylation, comme un analogue de l'AMP (Moore *et al.*, 1991). Comme nous l'avons vu dans l'introduction (figure 1.28), l'AMPK inactive alors l'ACC conduisant à une réduction cytosolique en malonyl-CoA et donc à un influx plus important des acides gras dans la mitochondrie par une levée d'inhibition de CPT1. Dans cette expérience, nous avons enfin testé 2 temps de pré-incubation des cellules en présence d'[\$^{14}\text{C}\$]-oléate dans le but de comparer les quantités de  $^{14}\text{CO}_2$  récupérées et de nous assurer que la radioactivité associée au filtre soit détectable au comptage.



La figure 3.5 présente les résultats de  $\beta$ -oxydation obtenus pour une pré-incubation de 90 min (A) ou 180 min (B) en présence d' $[^{14}\text{C}]$ -oléate. Pour chacune de ces conditions, les cellules sont préalablement incubées pendant 90 ou 180 min avec l' $[^{14}\text{C}]$ -oléate (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) et ce, en présence ou en l'absence d'AICAR (500  $\mu\text{M}$ ). Au terme de ces pré-incubations, les milieux sont transférés dans une nouvelle boîte de 12 puits, dégazés par l'ajout de perchlorate (70 %) et couverts par un filtre 3V (Whatman) pendant 60 min à 37°C sous agitation. Les filtres sont ensuite découpés et la radioactivité associée à ce filtre est comptée au compteur à scintillations. On vérifie l'effet attendu lors de la pré-incubation en présence d'AICAR qui induit une augmentation de la  $\beta$ -oxydation d'environ 50 % et ce, pour l'ensemble des conditions. D'autre part, on observe que la  $\beta$ -oxydation de l' $[^{14}\text{C}]$ -oléate dans les cellules traitées pendant 4 jours en présence des molécules pro-adipogènes est réduite par rapport aux contrôles et ce, respectivement de 45 % et 30 % pour des temps de 90 et 180 min de pré-incubation avec le traceur.

Ce résultat intéressant constitue un premier élément de réponse à notre problématique. En effet, pour les cellules engagées dans la différenciation, le rapport  $\beta$ -oxydation/incorporation est très faible et pourrait donc favoriser l'accumulation des acides gras et leur estérification en TAG. On a constaté lors de l'expérience que l'accumulation du traceur est plus importante pour le temps d'incubation de 180 min. A partir de ces données, nous avons choisi de conserver une période d'incorporation du traceur de 180 min pour l'expérience suivante. Ceci en raison d'une meilleure visualisation de l'effet de l'AICAR sur les cellules engagées dans la différenciation. Dans cette expérience, nous rechercherons l'effet des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives mitochondriales et des molécules pro-adipogènes sur la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

### *III.4.1 Résultats*

La figure 3.6 présente les résultats obtenus pour la mesure du taux de  $\beta$ -oxydation de l' $[^{14}\text{C}]$ -oléate dans des cellules 3T3-L1 (G12) incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 4 jours (A) et 8 jours (B) en présence d'antimycine A (10 nM), de FCCP (1  $\mu\text{M}$ ) ou dans des cellules dont la différenciation est induite par le cocktail inducteur de la différenciation (MIX 3). Dans certaines conditions, avant l'incubation de 180 min des cellules en présence de 1  $\mu\text{Ci/ml}$  d' $[^{14}\text{C}]$ -oléate (permettant l'incorporation du précurseur radioactif) contenant ou non

500  $\mu$ M d'AICAR, des cellules sont ou non pré-incubées 180 min en présence d'AICAR à la même concentration.

Après quatre jours de traitement, on n'observe pas de grande différence entre les taux de  $\beta$ -oxydation des acides gras et ce, quelle que soit la condition expérimentale (sans AICAR). Ces résultats suggèrent que la  $\beta$ -oxydation n'est pas modifiée par un traitement de 4 jours en présence des inhibiteurs de l'activité mitochondriale ou des molécules pro-adipogènes. On peut cependant observer une légère augmentation de la  $\alpha$ -oxydation induite par le FCCP (49 %), bien que non significative. Remarquons également que la présence d'AICAR à 500  $\mu$ M stimule la  $\alpha$ -oxydation quelle que soit la condition de traitement des cellules. Ce résultat valide une fois encore le test utilisé (figure 3.6 A). Par contre, dans le test de  $\alpha$ -oxydation réalisé après 8 jours de traitement, on observe que la différenciation s'accompagne d'une diminution (41 %) de la  $\alpha$ -oxydation des acides gras dans les cellules. De manière très intéressante, on remarque également une diminution encore plus importante (70 %) induite par l'antimycine A. Par contre, le FCCP qui n'induit pas d'accumulation de TAG dans les cellules est quant à lui capable d'induire une augmentation significative de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les cellules (79 %). De plus, même après 8 jours, l'AICAR est encore capable de stimuler la  $\alpha$ -oxydation des acides gras dans les cellules et ce dans toutes les conditions expérimentales testées (figure 3.6 B).

Ces résultats sont très intéressants et nous donnent des pistes de réflexion sur la compréhension du mécanisme par lequel les cellules incubées en présence d'antimycine A accumulent des vésicules de TAG, phénotype non observé pour un traitement des cellules par le protonophore FCCP.

### *III.4.2 Discussion*

Au vu de ces résultats, on peut suggérer que l'inhibition chronique des phosphorylations oxydatives mitochondriales des 3T3-L1 par l'antimycine A résulte en une accumulation de TAG qui est probablement médiée par une diminution d'activité de la voie catabolique de la  $\alpha$ -oxydation des acides gras dans la cellule. De la même manière, l'absence d'accumulation de TAG dans les cellules lors d'une incubation chronique avec le FCCP pourrait notamment s'expliquer par l'importance de la  $\beta$ -oxydation des acides gras après leur incorporation. Mentionnons ici que c'est suite à une diminution de l'oxydation des acides

gras à longue chaîne dans les cardiomyocytes incubés en hypoxie que Huss *et al* (2001) ont récemment démontré que les TAG s'accumulent dans ces cellules. En conditions physiologiques, ces cellules dépendent essentiellement de la  $\beta$ -oxydation des acides gras pour la production d'ATP (Huss *et al.*, 2001).

Etant donné que ces résultats sont très encourageants, nous avons décidé de poursuivre notre recherche en nous intéressant aux enzymes clés et régulatrices de la voie de la  $\beta$ -oxydation : les isoformes M- CPT1 et L-CPT1, et la CPT2. En effet, ces enzymes contrôlent l'influx d'acide gras sous forme d'acyl-CoA dans la mitochondrie, et régulent donc le taux de précurseurs disponibles pour la  $\beta$ -oxydation. Nous analyserons dans le chapitre qui suit, l'effet d'une incubation des cellules 3T3-L1 en présence de MIX 3, d'antimycine A ou de FCCP sur les taux de transcrits des isoformes de la CPT par une analyse de l'abondance des ARNm par la technique de la PCR en temps réel.

### ***III.5 Quantification des taux de transcrits des différentes isoformes de la CPT (M-CPT1, L-CPT1 et CPT2) par la technique de "real time PCR"***

Par cette technique de biologie moléculaire, nous avons pu comparer la quantité d'ARNm des différentes isoformes de la CPT. Cette technique est en effet souvent utilisée pour faire de l'analyse de l'expression différentielle de gènes au niveau transcriptionnel (Pfaffl *et al.*, 2002).

Pour rappel, ces enzymes sont impliquées dans la voie d'entrée des acides gras dans la mitochondrie afin d'acheminer les substrats de la  $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale. Parmi les isoformes des CPTs, la CPT1 est considérée comme l'étape limitante de ce processus (Chien *et al.*, 2000).

La description détaillée du protocole suivi est décrite au point II.8.2 Brièvement, des cellules 3T3-L1 ont été incubées pendant 8 jours en présence ou non (contrôles, CTL) de MIX 3, d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1  $\mu$ M). Les cellules sont ensuite lysées et l'ARN total est extrait. Pour nous assurer d'avoir suffisamment d'ARN, 4 boîtes de cellules par condition expérimentale ont été poolées. Après une rétro-transcription permettant de générer l'ADNc à partir des ARNm, l'amplification des ADNc d'intérêt est réalisée par une réaction de PCR avec des primers spécifiques de chaque isoforme. Dans la PCR en temps réel, le

SYBR Green, une molécule intercalante et fluorescente permet de visualiser l'amplification exponentielle. Le cycle pour lequel la courbe d'amplification croise le seuil de détection (Ct) est inversement proportionnel à la quantité d'ANDc présent et donc d'ARNm de départ dans les cellules. Les résultats sont ensuite normalisés par rapport à un gène dont l'expression n'est pas modifiée par la condition expérimentale (House Keeping Gene). Dans nos conditions, nous utilisons TBP (TATA Box Binding Protein)

Pour chaque condition expérimentale, la "real time PCR" est réalisée deux fois sur des doubles indépendants de RT-PCR à partir d'un pool unique d'extrait d'ARN total issu de 4 boîtes par condition.

### *III.5.1 Résultats*

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.7. A la figure 3.7 (A) qui montre le taux de transcrits de la L-CPT1, une isoforme abondante dans les 3T3-L1 (Brown *et al.*, 1997), on peut observer une diminution de l'ARNm de cette isoforme dans des cellules subissant un stress énergétique mitochondrial, ainsi que dans des cellules dont la différenciation est induite par le MIX 3. Ces diminutions sont respectivement d'environ 40 et 80 % par rapport aux contrôles, dont la valeur est arbitrairement portée à 1. Remarquons encore que le FCCP et l'antimycine A induisent une diminution comparable de cette isoforme, respectivement 32 et 39 %.

La deuxième série de résultats présentés à la figure 3.7 (B) reprend les taux de transcrits pour la M-CPT1. De nouveau, on remarque que les cellules traitées de manière chronique en présence d'antimycine A montrent une diminution du taux de transcrits de 60 % par rapport à la valeur des contrôles. Cependant, le traitement en présence de FCCP ne présente aucune variation d'expression. Enfin, les cellules dont la différenciation est induite par le MIX 3 présente également une diminution de la transcription de la M-CPT1 par rapport aux contrôles, qui est d'environ 25 %. Par ailleurs, la figure 3.7 (C) montre les taux de transcrits pour la CPT2. On observe une augmentation du taux de transcrits CPT2 de 5,5 fois par rapport aux contrôles dans des cellules dont la différenciation est induite par le MIX 3. Ceci est en parfait accord avec les données de Brown *et al.* (1997) (Brown *et al.*, 1997). Par contre, nous n'observons aucune modification dans les taux de transcrits de la CPT2 dans des cellules incubées en présence d'antimycine A ou de FCCP.

Ces résultats, bien que préliminaires, sont très intéressants car ils nous renseignent sur le taux de transcrits des isoformes CPT et ce, dans nos 4 conditions expérimentales. Ils indiquent que l'abondance globale de transcrits de l'isoforme CPT1 est fortement diminuée dans les cellules en différenciation ou incubées en présence d'antimycine A; alors qu'elle est moins diminuée dans les cellules traitées au FCCP.

Il faut également ajouter que la technique moderne de la "real time PCR" nous a permis de détecter l'isoforme M-CPT1 présente dans les adipocytes 3T3-L1, ce qui jusqu'à lors n'était pas possible par la technique du Northern blotting (Brown *et al.*, 1997).

Cependant, on ne peut encore rien conclure de la conséquence de ce taux de transcrits CPT puisque le niveau d'expression d'un gène au niveau transcriptionnel ne reflète pas toujours l'abondance de l'enzyme et encore moins son activité. En effet, l'expression d'un gène et l'activité de son produit sont soumises à de multiples mécanismes de régulation et ce, à différents niveaux : le taux de transcription, la stabilité de l'ARN messenger, le taux de traduction, la stabilité de la protéine et enfin les modifications post-traductionnelles activatrices ou inhibitrices.

C'est la raison pour laquelle, l'étape suivante de notre étude portera sur le dosage direct de l'activité enzymatique de la CPT1.

### ***III.6 Mesure de l'activité de la CPT1 dans des cellules subissant un stress énergétique mitochondrial induit par l'antimycine A***

Par cette technique, nous avons dosé l'activité de la CPT1 dans des 3T3-L1 incubées ou non en présence d'antimycine A (10 nM). Ce test consiste en la récupération des acides gras activés sous la forme d'acyl-CoA, transestérifiés sur la carnitine et transloqués dans l'espace intermembranaire mitochondrial par la CPT1.

Une expérience préliminaire de dosage d'activité de la CPT1 a été réalisée à partir d'extraits cellulaires enrichis en mitochondries de cellules L929, afin de déterminer les conditions du dosage et la quantité de matériel cellulaire de 3T3-L1 à utiliser par la suite. Nous avons également testé l'effet du malonyl-CoA (100 nM) sur l'activité de la CPT1. Rappelons simplement que le malonyl-CoA est un précurseur de la voie de biosynthèse des TAG qui inhibe l'activité de la CPT1 par interaction allostérique (point I.4.6.1).

Les cellules L929 sont incubées pendant 5 jours en présence de DHG + 10 % de SVF. Le jour du test, elles sont rincées, raclées et des homogénats sont obtenus après rupture

mécanique des membranes plasmiques à l'aide du "Dounce Tight". Ces homogénats sont ensuite centrifugés, poolés et resuspendus dans du tampon Tris-KCl. Des aliquots d'extraits enrichis en mitochondries (100, 50 et 25  $\mu$ l) sont alors incubés pendant 10 min à 37°C, en présence d'une mixture réactionnelle composée notamment de palmitoyl-CoA, de [ $^{14}$ C]-carnitine et de DL-carnitine contenant ou non (contrôles, CTL) du malonyl-CoA (100 nM). La réaction de transestérification est inhibée par l'addition de 500  $\mu$ l d'HCl (1,2 N) et la récupération des molécules de palmitoyl-CoA-[ $^{14}$ C]-carnitine est enfin réalisée par une extraction au butanol (500  $\mu$ l). L'extraction de la [ $^{14}$ C]-carnitine contaminante est effectuée par ajout de 60  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O, suivi d'une centrifugation. Un comptage de la radioactivité associée aux produits transestérifiés est réalisé sur un aliquot de 250  $\mu$ l.

La figure 3.8 présente les résultats de cette expérience de mise au point. On observe d'abord que l'activité de la CPT1 mesurée par l'accumulation du produit de transestérification marqué, est fonction de la quantité de protéines mitochondriales ajoutée. On remarque ensuite la spécificité du test par une forte diminution de l'activité de la CPT1 dans les cellules incubées en présence de malonyl-CoA. Nous avons également déterminé la quantité de matériel (évaluée par la quantité de protéines mitochondriales) que nous utiliserons par la suite sur des cellules 3T3-L1 incubées ou non en présence d'antimycine A. Nous avons choisi d'utiliser une concentration en protéines de 200  $\mu$ g/ml.

La figure 3.9 présente les résultats obtenus pour la mesure d'activité de la CPT1 dans des cellules 3T3-L1 (G15) incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) (10 nM). Le protocole suivi est identique à celui décrit ci-dessus. Sur base des résultats obtenus, on observe premièrement l'effet inhibiteur très marqué du malonyl-CoA sur l'activité de l'enzyme par une diminution d'activité d'environ 80-90 % par rapport à l'activité mesurée dans les tests contrôles réalisés sans malonyl-CoA. De façon très surprenante, on observe que l'activité de la CPT1 dans les cellules incubées en présence d'antimycine A est comparable aux contrôles.

Nous allons à présent rassembler les résultats obtenus afin d'en tirer des conclusions partielles.

(1) Nous savons que, par rapport aux cellules contrôles, les cellules en différenciation incorporent une quantité plus importante de glycérol et d'oléate et ce particulièrement aux jours 3 et 4, qu'elles présentent un taux de  $\beta$ -oxydation des acides gras plus faible et, enfin, qu'elles possèdent une abondance moindre des transcrits de l'isoforme CPT1. Ces résultats

sont compatibles avec le phénotype des adipocytes en différenciation, caractérisé par la formation de vésicules de TAG. En effet, il est bien connu qu'une diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras mitochondriale peut contribuer à l'accumulation de TAG dans le cytosol et qu'inversement, une augmentation de la  $\beta$ -oxydation s'accompagne d'une diminution des stocks de TAG dans la cellule (Caserta *et al.*, 2001). Nous avons montré que dans les 3T3-L1 en différenciation, le taux de  $\beta$ -oxydation diminuait par rapport au taux mesuré pour les cellules contrôles, ce qui est compatible avec la présence de vésicules de TAG dans le cytosol.

(2) Par ailleurs, nous savons également que, par rapport aux contrôles, les cellules traitées avec l'antimycine A incorporent peu de glycérol et d'oléate, qu'elles présentent un taux de  $\beta$ -oxydation qui est très faible, qu'elles possèdent une quantité de transcrits plus faible de la CPT1 et qu'enfin, elles montrent une même activité de l'enzyme CPT1.

(3) Enfin, nous savons également que les cellules traitées avec le FCCP n'incorporent pas plus de glycérol et d'oléate que les cellules contrôles, que leur taux de  $\beta$ -oxydation est très élevé et que leur taux de transcrits de la CPT1 est comparable aux contrôles.

Bien que ces 2 inhibiteurs provoquent un dysfonctionnement de la mitochondrie, ils induisent des phénotypes différents. Cette observation est tout à fait corrélée à la mesure de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. En effet, si la présence de vésicules de TAG est associée à une faible  $\beta$ -oxydation, ceci suggère que le taux d'incorporation d'acides gras par la mitochondrie est également diminué. Toutefois, contrairement à ce qui était attendu, l'antimycine A n'induit pas de changement d'activité de la CPT1 par rapport aux contrôles. Suite à cette dernière information, nous proposons plusieurs hypothèses. Etant donné que l'entrée des acides gras dans la mitochondrie est assurée par l'action combinée de plusieurs enzymes (CPT1, ACT, CPT2), il est possible que ce système soit inhibé au niveau de l'ACT ou de la CPT2 (par une diminution de l'expression de la protéine ou par une diminution de son activité), diminuant ainsi la quantité de substrat disponible pour la  $\beta$ -oxydation. Nous ne connaissons pas non plus l'état d'activité des autres enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation. Par ailleurs, parce que nous mesurons l'activité de la CPT1 sur des mitochondries purifiées, celles-ci pourraient "échapper" aux mécanismes de régulation cellulaires existants tel que l'inhibition par la malonyl-CoA. En effet, nous avons vérifié lors de ce test, l'effet inhibiteur du malonyl-CoA sur l'activité de la CPT1, mais nous ignorons la régulation éventuelle de la CPT1 par le malonyl-CoA au niveau des mitochondries présentes dans le cytosol de cellules incubées en présence d'antimycine A.

Il serait intéressant de mesurer l'activité de la CPT1 dans les deux autres conditions expérimentales : FCCP et MIX 3.

Au vu du résultat obtenu par le test d'activité de la CPT1, qui nous confirme que le malonyl-CoA inhibe bien l'activité de la CPT1, nous voulions tester l'effet du malonyl-CoA exogène sur l'accumulation de TAG et donc, sur l'état de différenciation des cellules 3T3-L1 soumises à nos différentes conditions expérimentales. La figure 3.10 présente l'effet du malonyl-CoA sur la quantité de TAG accumulée dans des 3T3-L1 (G16) traitées ou non (contrôles, CTL) pendant 8 jours avec le cocktail inducteur de la différenciation MIX 3, avec l'antimycine A (10 nM) ou le FCCP (1  $\mu$ M) et ce, en présence ou en absence de malonyl-CoA (1, 10, 100  $\mu$ M). Une coloration à l'Oil Red O est effectuée après 8 jours d'incubation. Les cellules sont rincées, fixées et colorées avant la quantification au spectrophotomètre. On constate que les cellules incubées en présence de malonyl-CoA n'accumulent pas plus de TAG que les contrôles correspondants et ce, quelle que soit la concentration utilisée. C'est pourquoi, ces observations nous amènent à penser que si la molécule entre dans les cellules, seule une faible quantité de malonyl-CoA parvient à traverser la membrane plasmique. Il faudrait probablement utiliser une concentration en malonyl-CoA plus élevée sur les cellules que sur les extraits enrichis en mitochondries, pour obtenir éventuellement un effet du malonyl-CoA. Il n'est pas à exclure non plus que l'inhibition de la CPT1 conduise par elle-même à l'accumulation de TAG dans la cellule. Des expériences supplémentaires seraient donc nécessaires pour comprendre le rôle joué par le malonyl-CoA dans l'apparition des phénotypes.

Pour conclure ce chapitre portant sur l'incorporation et le devenir des acides gras dans des cellules 3T3-L1 dont la différenciation est induite par le cocktail inducteur MIX 3, ou soumises à un stress énergétique mitochondrial par l'antimycine A ou le FCCP, nous pouvons dire que les mécanismes par lesquels les cellules traitées avec le MIX 3 ou avec l'antimycine A accumulent des vésicules de TAG diffèrent probablement. C'est donc à partir de ces données que nous nous sommes orientés vers un autre substrat énergétique important : le glucose.

Par une approche comparable, nous allons nous intéresser à l'incorporation du glucose dans les cellules, aux mécanismes impliqués et un rôle potentiel de la cette molécule sur les phénotypes de nos différents modèles cellulaires.



### ***III.7 Mesure de l'incorporation du 2-D-déoxyglucose tritié (2-[<sup>3</sup>H]DG) par les 3T3-L1 en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial***

Dans une première étape de notre étude sur les flux de glucose, nous avons mesuré la quantité de 2-déoxy-D-[1,2-<sup>3</sup>H]glucose (2-[<sup>3</sup>H]DG) incorporée par des cellules 3T3-L1 incubées en présence du cocktail de différenciation MIX 3 ou en présence d'antimycine A (10 nM) selon le protocole détaillé au point II.5. Ces dosages nous ont permis de comparer la l'incorporation de substrat énergétique par des 3T3-L1 dans ces différentes conditions.

#### ***III.7.1 Résultats***

Dans une première expérience de cinétique, nous avons réalisé des mesures d'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par des cellules 3T3-L1 ayant été pré-incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 5 h, 1, 2, 4 et 8 jours d'incubation en présence de l'antimycine A ou en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX3.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.11. Par rapport aux cellules contrôles, qui sont incubées en présence de DHG-L1 + 10 % de SVF, on observe qu'une incubation des cellules en présence du MIX3 entraîne une augmentation faible et progressive de l'incorporation de glucose au cours du temps. Par contre, on peut remarquer que l'antimycine A stimule fortement l'incorporation de glucose et ce, de manière rapide et soutenue. L'augmentation d'incorporation de glucose par les cellules en présence d'antimycine A est statistiquement significative et atteint un maximum de 7 fois par rapport aux cellules contrôles et ce, après 2 jours d'incubation avec l'inhibiteur.

#### ***III.7.2 Discussion.***

Après des expériences de mise au point et l'adaptation du protocole décrit par Loike *et al.* (1992) à notre modèle cellulaire 3T3-L1, nous avons mesuré l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG au cours du temps (Loike *et al.*, 1992). Nous avons montré que l'effet de l'inhibiteur mitochondrial antimycine A augmente fortement l'incorporation de glucose. Cette importante entrée de glucose peut probablement s'expliquer par le haut pouvoir glycolytique des cellules incubées en présence d'antimycine A. En effet, l'inhibition des phosphorylations oxydatives oblige la cellule à activer la glycolyse afin de générer l'ATP nécessaire à sa survie. Mais il

est probable que tout le glucose incorporé n'est pas uniquement utilisé de manière rapide à des fins énergétiques. En effet, on peut postuler que cette augmentation de glucose dans la cellule participe à la synthèse de TAG dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Rappelons qu'un des produits en aval de la métabolisation du glucose est l'acétyl-CoA, premier précurseur dans la voie de synthèse des acides gras. Le mécanisme potentiel de conversion du glucose en TAG sur base des données publiées par Ruan *et al.* (2001) a été présenté au point I.3.5 (Ruan *et al.*, 2001).

Il faut encore ajouter que la concentration en antimycine A utilisée dans cette expérience est accidentellement de 100 nM et non de 10 nM. Il est cependant peu probable que les résultats soient radicalement différents par rapport à la concentration de 10 nM. En effet, des travaux antérieurs menés au laboratoire montrent un phénotype et une accumulation de TAG qui sont très comparables pour ces 2 concentrations en antimycine A.

Il est surprenant de constater qu'en présence d'insuline, les cellules dont la différenciation est induite par MIX 3 n'incorporent pas beaucoup plus de glucose que les cellules contrôles. On peut proposer plusieurs hypothèses : Premièrement, les différents tests ont été réalisés après une longue période d'incubation des cellules en présence d'insuline or, on sait que l'effet de l'insuline est transitoire. De plus, la concentration en insuline utilisée est une concentration non physiologique (865  $\mu$ M).

On peut penser que bien qu'il y ait des ressemblances phénotypiques telle que l'accumulation de TAG dans les 3T3-L1 en différenciation induite par le MIX 3 ou stressées énergétiquement par l'antimycine A, ce stockage semble se produire à partir de l'incorporation de substrats différents. Nous allons maintenant essayer de vérifier certaines de ces hypothèses et comprendre pourquoi l'incubation en présence d'insuline n'induit pas une incorporation plus importante de glucose. Mais avant cela, nous allons vérifier que le transport et l'incorporation du glucose par les cellules sont des processus spécifiques.

### ***III.8 Test de spécificité d'incorporation de 2-D déoxyglucose tritié (2- $[^3H]$ DG).***

Sur base des résultats précédents, nous avons effectué deux types de contrôles. Nous avons voulu vérifier d'une part, que l'entrée du glucose est le résultat d'une augmentation d'incorporation médiée par des transporteurs spécifiques GLUTs et d'autre part, que l'éthanol utilisé comme solvant de l'antimycine A (dilution finale de 1/10 000), ne provoque pas

l'incorporation de glucose en perturbant la perméabilité de la membrane plasmique. Nous avons donc réalisé deux types d'expériences.

Dans la première, nous utilisons la cytochalasine B, qui est ajoutée pendant le test d'incorporation du glucose. Cette molécule interagit avec, et inhibe de manière allostérique les transporteurs GLUTs, empêchant ainsi l'entrée de glucose dans la cellule. Des cellules 3T3-L1 (G16) sont préalablement incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 4 jours en présence des molécules pro-adipogènes MIX 3 ou en présence d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1  $\mu$ M). Elles sont ensuite incubées pendant 30 min en présence de 2-[<sup>3</sup>H]DG contenant ou non de la cytochalasine B (40 nM), rincées, lysées et un aliquot est récupéré pour le comptage de la radioactivité. Les résultats présentés à la figure 3.12 confirment les résultats obtenus précédemment (figure 3.11). En effet, on observe qu'après des incubations de 4 jours, le MIX 3 n'induit qu'une légère augmentation de l'incorporation du glucose dans les cellules (1,5 fois) alors que l'antimycine A l'augmente fortement (3,5 fois). Il est également très intéressant de constater que le FCCP a peu d'effet sur l'incorporation de glucose par les cellules 3T3-L1. Ces résultats démontrent également que l'incorporation de glucose est spécifique puisque la cytochalasine B bloque l'entrée du glucose à plus de 90 % et ce, quelle que soit la condition expérimentale. Ce résultat montre bien que cette entrée est médiée par diffusion facilitée, impliquant des transporteurs spécifiques au glucose. Dans la seconde expérience contrôle, nous testons simplement l'effet de l'éthanol sur l'incorporation du glucose. A la figure 3.13, nous vérifions que l'éthanol, connu entre autres pour perturber la perméabilité de la membrane plasmique, n'est pas responsable de l'incorporation accrue de 2-[<sup>3</sup>H]DG par les cellules incubées en présence d'antimycine A.

En conclusion, nous avons vérifié que l'incorporation de glucose à travers la membrane plasmique est bien médiée spécifiquement par des transporteurs au glucose (GLUTs). Les techniques du Western blotting et de marquage en immunofluorescence nous permettront par la suite d'étudier l'abondance et de visualiser ces transporteurs GLUT1 et GLUT4 à la surface des cellules 3T3-L1.

L'expérience suivante consiste à réaliser une cinétique d'incorporation de glucose en présence ou non d'insuline des cellules 3T3-L1 dont la différenciation est induite par les molécules pro-adipogènes MIX3,

### ***III.9 Mise en évidence de l'effet et de l'insuline, de la dexaméthasone et du cocktail inducteur de la différenciation sur l'incorporation de 2-D-déoxyglucose tritié (2-[<sup>3</sup>H]DG).***

Bien que cela nous a écarté du cadre de notre problématique, nous avons voulu rechercher la/les raison(s) pour laquelle/lesquelles des cellules 3T3-L1 incubées en présence du cocktail inducteur de la différenciation incorporent une faible quantité de 2-[<sup>3</sup>H]DG, même en présence d'insuline. Dans une cinétique d'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG, nous avons également testé l'effet d'une pré-incubation des cellules en présence d'insuline, de MIX 3 ou de dexaméthasone sur cette incorporation. En effet, ce glucocorticoïde compris dans le MIX 3 est bien connu pour inhiber l'incorporation du glucose, en disruptant le "signaling" de l'insuline par la réduction de la quantité d'IRS et de PKB (Sakoda *et al.*, 2000). De plus, plusieurs hypothèses sont émises sur le fait que la dexaméthasone pourrait également diminuer l'expression d'une protéine motrice associée aux vésicules de stockage du transporteur spécifique au glucose GLUT4 et impliquée dans sa translocation en membrane plasmique (point I.3.4.1.) (Buren *et al.*, 2002) (Sakoda *et al.*, 2000). C'est pourquoi nous avons réalisé des mesures d'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par des cellules 3T3-L1 (G7) ayant été traitées ou non (contrôles, CTL) pendant 2 jours en présence du cocktail pro-adipogène (MIX 3), en présence d'insuline (5 µg/ml) ou de dexaméthasone (1 µM). Les cellules sont incubées pendant des temps croissants en présence d'insuline et sont ensuite incubées pendant 30 min avec 1 µCi/ml de 2-[<sup>3</sup>H]DG dilué dans du PBS. Elles sont ensuite rincées, lysées et le comptage de la radioactivité est réalisé sur un aliquot. Les résultats sont présentés à la figure 3.14.

On observe premièrement que l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par les contrôles, qui correspondent à l'incubation des cellules en présence de DHG-L1 + 10 % de SVF, augmente progressivement au cours du temps. Par ailleurs, on observe une diminution d'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par des cellules traitées pendant 2 jours en présence d'insuline ainsi que par des cellules traitées à la dexaméthasone par rapport aux contrôles. Ces diminutions sont respectivement de 31 % et 38 % pour une période d'incubation de 3 h. On constate enfin que l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par des cellules traitées avec le MIX 3 induite par l'insuline, est fortement inhibée. Cette faible incorporation correspond à une diminution de 61 % par rapport aux cellules contrôles après 3 h d'incubation, avec une différence statistiquement significative ( $p < 0,001$ ).

Ces résultats nous mènent à penser d'une part que la présence d'insuline, qui est utilisée en concentration non physiologique (865  $\mu$ M), soit en partie responsable de la plus faible incorporation de 2-[ $^3$ H]DG par les cellules en différenciation induite. En effet, le profil correspondant à l'incorporation de glucose en réponse à l'insuline par les cellules pré-traitées à l'insuline est plus bas que celui des cellules contrôles. D'autre part, il a été intéressant de tester l'effet de la dexaméthasone car on s'aperçoit 1) que les cellules traitées depuis 2 jours présentent une diminution de cette incorporation de 2-[ $^3$ H]DG par rapport aux contrôles, 2) que les cellules traitées en présence des molécules pro-adipogènes (MIX 3) présentent un profil d'incorporation "écrasé" résultant des actions/effets combinés de l'insuline et de la dexaméthasone et enfin 3) que si on se rapporte aux résultats présentés à la figure 3.11, on voit que l'incorporation de glucose par des cellules dont la différenciation est induite par le MIX 3, augmente progressivement au cours des 8 jours. Ceci nous permet de penser que l'action inhibitrice de la dexaméthasone s'atténuerait au cours du temps, ce qui favoriserait l'activation de la/des cascades de transduction(s) menant à l'incorporation du glucose.

En conclusion de cette première étape de notre étude sur les flux du glucose, nous pouvons dire que les cellules incubées en présence d'antimycine A incorporent le glucose de manière rapide, soutenue et spécifique.

De nombreuses publications rapportent que cette incorporation se passe par diffusion facilitée qui est assurée par des transporteurs spécifiques au glucose (GLUTs) (Joost *et al.*, 2001). Elles montrent également que qu'en réponse à l'insuline, l'isoforme GLUT4, qui est contenue dans des vésicules de stockage intracytoplasmiques (GSVs), est responsable d'une incorporation importante de glucose résultant d'un mécanisme de translocation en membrane plasmique.

Nous nous sommes ensuite dirigés sur l'étude mécanistique de l'influx du glucose. La seconde étape de cette approche portera donc sur l'étude de 2 de ces transporteurs, GLUT1 et GLUT4, par des techniques de Western blotting et de marquages en immunofluorescence.

### ***III.10 Mise en évidence de l'abondance du transporteur au glucose GLUT1 en Western blotting***

L'augmentation de l'incorporation de 2-[ $^3$ H]DG par les cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A pourrait résulter d'une augmentation de l'expression et/ou du trafic

intracellulaire conduisant les transporteurs de glucose dans la membrane plasmique. Parmi les transporteurs à considérer, mentionnons GLUT1 et GLUT4, les principales isoformes impliquées dans l'incorporation de glucose induite par l'insuline et une déplétion en ATP dans les cellules 3T3-L1 (Kang *et al.*, 2001). Pour ce qui est des mécanismes de régulation de ces deux isoformes, une littérature abondante rapporte que la présence de GLUT4 dans la membrane plasmique est essentiellement le résultat d'une augmentation de sa translocation à partir de vésicules de stockage sans augmentation de son abondance (Kang *et al.*, 2001). Par contre, le transport de glucose basal dans les 3T3-L1 est essentiellement médié par GLUT1. Pour chercher à savoir si l'augmentation d'incorporation du glucose dans la cellule, induite par l'antimycine A, est le résultat d'une augmentation de l'expression et de l'abondance de GLUT1, nous avons tenté de rechercher l'abondance de la protéine GLUT1 en Western blot.

Dans cette expérience, des cellules 3T3-L1 ont été incubées ou non (contrôles, CTL) en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3 ou d'antimycine A (10 nM). Des lysats cellulaires clairs ont ensuite été préparés à partir de ces cellules après 1, 2, 3, 4, 7 et 9 jours d'incubation et l'abondance de la protéine GLUT1 a été recherchée en Western blot. La figure 3.15 montre l'abondance de la protéine GLUT1 présente dans ces conditions. Un contrôle de la charge protéique est réalisé par la détection de la protéine TBP dans les différentes pistes. L'observation de l'intensité des bandes dans les différents échantillons suggère que l'abondance de GLUT1 est équivalente, quelle que soit la condition expérimentale étudiée. En effet, on n'observe certainement pas d'augmentation de l'abondance dans les cellules incubées en présence d'antimycine A et les signaux légèrement plus forts obtenus pour les jours 1, 2, 3, 4 de la différenciation semblent également associés à une quantité de protéines chargées plus importante comme l'atteste le signal pour la TBP.

Cependant, la recherche de l'abondance de la protéine totale en Western blot n'a pas beaucoup de sens en raison du fait que seul la proportion de transporteurs exprimée en membrane est susceptible de participer au transport du glucose dans la cellule. Nous pourrions refaire des Western blot sur des fractions enrichies en membrane plasmique (Heart *et al.*, 2000). En utilisant cette technique Kang *et al* (2001) ont montré que le  $\text{NaN}_3$  et le DNP (dinitrophénol) augmentent l'abondance de GLUT1 dans la membranes plasmiques. Nous avons choisi d'analyser l'abondance des deux transporteurs GLUT1 et GLUT4 dans la membrane plasmique par une approche en immunofluorescence et observation en microscopie confocale

### ***III.11 Mise en évidence de l'abondance des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 dans la membrane plasmique en immunofluorescence et microscopie confocale.***

Cette technique nous a permis de visualiser l'abondance des isoformes GLUT1 et GLUT4 uniquement exprimés dans la membrane plasmique. Pour y parvenir, nous devons utiliser des anticorps primaires dirigés contre les domaines extracellulaires NH<sub>2</sub>-terminaux des transporteurs et réaliser un marquage sur des cellules non perméabilisées.

Dans une expérience préliminaire, nous avons d'abord voulu visualiser et comparer les « patterns » de marquages obtenus pour des cellules perméabilisées ou non et ce, pour les deux transporteurs GLUT1 et GLUT4.

Les cellules 3T3-L1 sontensemencées sur des lames couvre-objets et incubées pendant 2 jours dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVF. Les cellules sont ensuite fixées à la PFA et perméabilisées (2) ou non (1) avant le marquage de GLUT1 (B) et GLUT4 (A) avec respectivement des anticorps primaires polyclonaux de chèvre dirigés contre les domaines NH<sub>2</sub>-terminaux des transporteurs. Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps de lapin anti-chèvre conjugués à une molécule fluorescente Alexa 488 nm (pour GLUT1) ou Alexa 568 nm (pour GLUT4). Le montage sur lame porte-objet est réalisé au Mowiol et l'observation est ensuite réalisée en microscopie confocale (figure 3.16).

On peut remarquer que le pattern de marquage ponctué pour GLUT1 est similaire à celui obtenu pour un marquage sur des cellules perméabilisées (B2) ou non (B1). Ces observations sont compatibles avec le fait que le transporteur GLUT1 ne s'accumule pas ou peu dans des vésicules intracellulaires. Par contre, pour GLUT4, le marquage sur des cellules perméabilisées génère un type de marquage différent. On peut en effet observer beaucoup plus de marquage intracellulaire. Ceci est en accord avec l'accumulation intracellulaire de ce transporteur, au sein de vésicules, attendant un signal de translocation en membrane après stimulation (Guilherme *et al.*, 2000) (Pessin *et al.*, 1999). Enfin, nous pouvons dire que, les marquages sur des cellules non perméabilisées permettent de mettre en évidence les transporteurs au glucose qui sont présents dans la membrane plasmique et ce, tant pour GLUT1 que GLUT4. L'abondance de ces deux transporteurs est cependant faible.

Afin d'identifier le transporteur au glucose qui pourrait être responsable de l'augmentation d'incorporation de glucose dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence

d'antimycine A, nous avons recherché l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT4 dans la membrane plasmique de cellules 3T3-L1 pré-incubées en présence de cet inhibiteur mitochondrial. Nous avons également comparé les « patterns » de marquages obtenus dans nos différentes conditions expérimentales.

Des cellules 3T3-L1 (G13) sont doncensemencées sur des lames couvre-objet et incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 2 jours en présence du MIX 3, d'antimycine A (10 nM) ou de FCCP (1  $\mu$ M). Les cellules sont fixées à la PFA mais non perméabilisées et le marquage des transporteurs GLUT1 et GLUT4 est réalisé comme décrit ci-dessus. La figure 3.17 reprend les micrographies obtenues pour GLUT1 (A) et GLUT4 (B). On peut observer que l'abondance des deux isoformes en surface des cellules traitées ou non en présence du cocktail inducteur de la différenciation MIX 3 ou de FCCP est très faible. Par contre, on remarque que les cellules pré-incubées pendant 2 jours en présence d'antimycine A expriment une quantité plus importante des transporteurs GLUT1 et GLUT4 en membrane plasmique. Ceci est visualisé par un nombre de spots de marquage plus important sur des cellules pré-incubées en présence d'antimycine A. Ces observations sont cohérentes et corrélées aux tests d'incorporation du 2-[<sup>3</sup>H]DG (figure 3.11).

Sur base de nos résultats, et bien que nous ne pourrions pas aller beaucoup plus loin pour tenter d'identifier le ou les transporteurs impliqué(s) dans l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A, nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs de la voie de la PI3-kinase (wortmaninne et LY 294002) pour tenter d'inhiber l'incorporation de glucose dans ces conditions. La voie de la PI3-kinase a été choisie sur base de la littérature, qui rapporte que cette cascade de transduction du signal qui est activée en réponse à l'insuline, stimule la translocation des vésicules contenant GLUT4 dans la membrane plasmique (Saltiel *et al.*, 2001).

De plus afin de pouvoir discriminer l'importance de la translocation des transporteurs de la nécessité d'une synthèse de protéines *de novo*, nous utiliserons la cycloheximide dans le but de préciser la ou les voies impliquée(s) dans l'accumulation de GLUT4 et/ou GLUT1 dans la membrane plasmique.



### ***III.12 Effets de la wortmannine, du LY 294002 et de la cycloheximide sur l'incorporation de de 2-[<sup>3</sup>H]DG induite par des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A.***

#### ***III.12.1 Résultats***

Nous avons donc recherché l'importance de la translocation et/ou de la synthèse *de novo* de GLUT1 et GLUT4 ainsi que l'implication éventuelle de la voie de la PI3-kinase dans l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par des cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A (10 nM). Afin d'y parvenir, nous utiliserons des inhibiteurs spécifiques de la voie de la PI3-kinase le LY 294002 et la wortmannine (Ishibashi *et al.*, 2000), ainsi que la cycloheximide, un inhibiteur bien décrit de la synthèse des protéines (Valverde *et al.*, 1997). Les concentrations ont été choisies sur base de la littérature (Ishibashi *et al.*, 2000) (Valverde *et al.*, 1997).

Nous avons donc testé l'effet de ces molécules sur l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG par des cellules incubées pendant 2 jours avec l'antimycine A (10 nM). Nous avons choisi de pré-incuber les cellules pendant 4 h en présence des différents inhibiteurs aux concentrations de 1, 10 et 50  $\mu$ M pour le LY 294002, de 0,1, 1 et 10  $\mu$ M pour la wortmannine et de 1, 10 et 100  $\mu$ M pour la cycloheximide. Les 3T3-L1 sont ensuite incubées pendant 30 min en présence du 2-[<sup>3</sup>H]DG (1  $\mu$ Ci/ml) dilué dans du PBS contenant ou non les inhibiteurs aux même concentrations. Les résultats sont présentés à la figure 3.18. On observe une inhibition de l'augmentation d'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG induite par l'antimycine A par des cellules pré-incubées en présence du LY 294002 ou de la wortmannine. Ces inhibitions sont dose-dépendantes et significatives à partir de 10  $\mu$ M en LY 294002 ( $p < 0,001$ ) et 1  $\mu$ M en wortmannine ( $p < 0,05$ ). Nous constatons que pour une concentration de 10  $\mu$ M, les inhibitions respectives obtenues en présence de LY 294002 et de wortmannine sont respectivement de 47,3 % et de 48 %. Par contre, la cycloheximide ne diminue l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG que de 19 % et ne présente pas d'effet dépendant de la concentration.

Vu ces résultats intéressants qui suggèrent que l'incorporation de glucose par des 3T3-L1 induite par l'antimycine A implique une translocation de GLUT4 et ce, par la voie de la PI3-kinase, nous avons recherché l'effet de ces inhibiteurs sur l'expression en membrane de GLUT1 et GLUT4 par des cellules incubées en présence d'antimycine A. Nous visualiserons

l'abondance de ces transporteurs en immunofluorescence et microscopie confocale comme décrit ci-dessus au point III.11.

### ***III.13 Effets de la wortmannine, du LY 294002 et de la cycloheximide sur l'expression en membrane des transporteurs GLUT1 et GLUT4 de 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A.***

Les deux inhibiteurs de la voie PI3-kinase et la cycloheximide ont été testés sur la translocation de GLUT1 et GLUT4 dans la membrane plasmique. Les concentrations les plus fortes qui donnaient le maximum d'inhibition sur l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG ont été testées. Nous avons choisi de pré-incuber des cellules, préalablement traitées en présence d'antimycine A (10 nM) pendant 2 jours avec l'antimycine A (10 nM), pendant 4 h en présence de 50  $\mu$ M pour le LY 294002, de 10  $\mu$ M pour la wortmannine ou de 100  $\mu$ M pour la cycloheximide. Les résultats de l'observation en microscopie confocale suite au marquage en immunofluorescence des transporteurs GLUT1 et GLUT4 sont respectivement présentés aux figures 3.19 et 3.20. On peut constater que le LY 294002 à 50  $\mu$ M, qui diminue l'incorporation de 2-[<sup>3</sup>H]DG d'environ 75 % (Figure 3.18), est également capable de diminuer la translocation de GLUT4 dans la membrane plasmique de cellules 3T3-L1 préalablement traitées en présence d'antimycine A. Les résultats sont beaucoup plus difficiles à interpréter pour le transporteur GLUT1. La cycloheximide ne semble pas non plus affecter les patterns de marquage des transporteurs GLUT1 ou GLUT4.

#### ***III.13.1 Discussion***

Les résultats du Western blot confirment que l'expression du transporteur GLUT1 dans des 3T3-L1 n'est pas modifiée par une incubation en présence du cocktail pro-adipogène, pas plus que pour des cellules incubées en présence d'antimycine A. De plus, les expériences de marquages en immunofluorescence nous permettent de suggérer que les abondances des transporteurs GLUT1 et GLUT4 sont plus importantes à la surface des cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A pendant 2 jours. Ceci nous amène à penser que les 2 isoformes pourraient agir en synergie dans le but de permettre un maximum de molécules de glucose d'entrer dans les cellules

Nous observons donc une bonne corrélation entre l'expression des transporteurs en membrane et les incorporations de glucose décrites préalablement (point III.12). En effet, le FCCP et le traitement pro-adipogène n'induisent pas ou peu d'incorporation de glucose dans les cellules 3T3-L1 alors que l'antimycine A qui stimule cette incorporation induit également la translocation du ou des transporteurs dans la membrane plasmique.

Toutefois, sur base de ces résultats préliminaires, nous devons rester prudents car, comme il n'existe pas d'inhibiteur spécifique discriminant, les différents transporteurs au glucose, il est difficile de préciser la contribution de chacun de ces transporteurs dans l'augmentation de l'incorporation de glucose par des 3T3-L1 induite par l'antimycine A.

Remarquons de manière très intéressante que le FCCP, qui induit une diminution de charge en ATP dans des 3T3-L1 comparable à celle induite par un traitement des cellules en présence d'antimycine A, n'induit ni augmentation de la présence des transporteurs au glucose dans la membrane, ni augmentation d'incorporation de glucose dans la cellule. Le mécanisme est donc probablement à chercher ailleurs que dans la diminution de la charge en ATP de la cellule.

De nombreuses publications récentes rapportent que suite à un stress oxydatif, la cellule incorpore une quantité importante de glucose qui, selon les auteurs, ne passerait pas par une augmentation d'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT4 (Kang *et al.*, 2001), ni par une augmentation de la translocation de GLUT4 (Rudich *et al.*, 1998; Tirosh *et al.*, 2001), mais bien par une quantité plus abondante de GLUT1 dans la membrane plasmique (Kang *et al.*, 2001).

S'il existe beaucoup de données dans la littérature qui parlent des effets de l'inhibition mitochondriale sur l'incorporation de glucose induite par l'insuline, on retrouve peu de données sur les mécanismes responsables de l'incorporation de glucose induite par des inhibiteurs métaboliques de la mitochondrie. Cependant, il semble bien accepté que la présence plus abondante des transporteurs GLUT1 et/ou GLUT4 en membrane nécessite une translocation et ce, même si les mécanismes qui y conduisent ne font pas l'unanimité. En effet, il existe dans la littérature, une controverse sur les mécanismes proposés pour expliquer l'augmentation de l'incorporation de glucose induite par un stress métabolique comme l'hypoxie, le DNP. En fonction des types cellulaires et des modèles utilisés pour générer ces stress, on peut dégager une voie dépendante de la PI3-kinase et une voie indépendante de cette enzyme, mais dépendante de l'AMPK (Hayashi *et al.*, 2000).

Nous terminerons ce travail par la recherche d'un rôle régulateur éventuel que le glucose intracellulaire pourrait assurer dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Pour cela, nous allons rechercher dans une expérience préliminaire, un effet du glucose sur l'activation d'un facteur de transcription activable par le glucose : ADD1/SREBP1. En effet, comme nous l'avons vu au point I.3.6, le glucose sous la forme d'un de ses métabolite, participe activement à l'expression d'enzymes impliquées dans la conversion du glucose en TAG par l'activation de facteur de transcription (Hasty *et al.*, 2000; Ruan *et al.*, 2001). On sait par exemple que chez les rongeurs alimentés avec un régime riche en hydrates de carbone, l'expression de gènes impliqués dans le stockage de l'énergie est augmentée dans le tissu adipeux et le foie. De plus, la présence de glucose, à forte concentration, et d'insuline sont nécessaires pour que des hépatocytes surexpriment des gènes impliqués dans la glycolyse et la synthèse d'acides gras à partir de glucose tels que la L-PK, la FAS et l'ACC (Foretz *et al.*, 1999b). De manière très intéressante, on retrouve des séquences SRE dans les promoteurs de ces gènes. Le glucose serait donc capable de réguler l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse et la glycolyse par l'activation du facteur de transcription SREBP1 bien décrit pour son rôle dans l'adipogenèse (Foretz *et al.*, 1999b).

Nous avons ensuite choisi de mesurer l'activation de la transcription dépendante de la protéine SREBP1 dans des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A ou de MIX3.

### ***III.14 Etude de l'activité transcriptionnelle de SREBP1 par transfection d'un système rapporteur luciférase.***

Ayant montré que les cellules 3T3-L1 incorporent essentiellement du glucose suite à une inhibition des phosphorylations oxydatives par l'antimycine A, on a cherché à savoir si le facteur de transcription SREBP1 était transcriptionnellement plus actif dans les cellules 3T3-L1 incubées dans cette condition.

Pour se faire, nous avons co-transfecté des cellules 3T3-L1 avec un plasmide rapporteur codant pour le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur authentique du récepteur aux LDL (Sato *et al.*, 1996). Ce promoteur contient notamment un site de liaison SRE (5'-ATC ACCCCAC-3') et permet ainsi de quantifier l'activation de ce facteur de transcription en mesurant l'activité de la luciférase. Le second plasmide que nous utiliserons code pour le gène de la  $\beta$ -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur, CMV et est

utilisé pour la normalisation de l'activité de la luciférase et tenir compte ainsi de l'efficacité de la transfection..

### *III.14.1 Résultats*

Des cellules 3T3-L1ensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de 12 puits ont été co-transfectées le lendemain avec le Superfect en présence de 0,5  $\mu$ g de plasmide rapporteur Luciférase, 0,25  $\mu$ g d'une construction codant la  $\beta$ -galactosidase et 0,25  $\mu$ g d'un vecteur vide pGL2 (contrôles, CTL) (A) ou 0,25  $\mu$ g d'un plasmide codant pour la forme sauvage de la protéine SREBP1 (B) susceptible d'activer le gène rapporteur. La transfection est arrêtée après 6 h et les milieux sont remplacés par du DHG-L1 + 10 % SVF contenant ou non (contrôles, CTL) le MIX3 ou l'antimycine A (10 nM). Le dosage de l'activité de la luciférase, proportionnelle à l'activation du facteur SREBP1, est réalisé après 24 et 48 h post-transfection. Pour le temps 6 h, les transfections sont arrêtées par du DHG + 10 % de SVF et les incubations avec les molécules ont lieu le lendemain. La figure 3.21 présente les résultats obtenus pour l'activation transcriptionnelle dépendante de SREBP1 endogène (A) et pour l'activation induite par la surexpression de SREBP1 (B).

Dans cette expérience préliminaire, on confirme d'abord que les conditions de transfection des 3T3-L1 sont adéquates à la vue de l'importance de l'activation transcriptionnelle mesurée par une surexpression de SREBP1. En effet, dans ces conditions, on obtient des activités de 157, 230 et 82 fois la valeur des contrôles correspondants, respectivement après 6, 24 et 48 h. D'autre part, après une incubation des cellules de 24 h en présence d'antimycine A, on observe une induction de l'activation transcriptionnelle du facteur de transcription SREBP1 endogène. Cette augmentation est de 4,5 fois par rapport aux contrôles. Cette activation semble transitoire car, pour un temps de 48 h post-transfection, on n'observe plus d'activation. Il est cependant difficile de tirer une conclusion sur cette dernière observation car il est également possible que dans le système de transfection transitoire utilisé, les constructions soient dégradées ou diluées. En effet, l'importante activité luciférase après 48 h est également observée pour la condition de surexpression de SREBP1. Par contre, on n'observe aucune augmentation de l'activation de SREBP1 suite à un traitement des cellules en présence du MIX3 et ce, quel que soit le temps considéré.

### III.14.2 Discussion

Tout d'abord, mentionnons que cette expérience unique faite en double est tout à fait préliminaire. Si les résultats se confirment, ils sont toutefois très intéressants car ils indiquent que l'antimycine A, qui induit l'incorporation de glucose dans la cellule, induit également l'activation du facteur de transcription SREBP1. Nous constatons que l'activité transcriptionnelle de SREBP1 est importante après 24 h d'incubation en présence de cette molécule. Cette donnée est en accord avec Hasty *et al.*, qui rapportent que le changement de concentration intracellulaire du facteur de transcription se produit à partir de après 12 h d'incubation d'hépatocytes murins, en présence d'un milieu riche en glucose et en insuline (Hasty *et al.*, 2000), ce qui suggère que ce facteur de transcription est activé par un des métabolites du glucose.

Enfin, un dernier renseignement intrigant fourni par Dooley *et al.* (1999) est que la protéine CREB, connue pour être phosphorylée et activée dans le processus de communication rétrograde entre la mitochondrie non-fonctionnelle et le noyau (Arnould *et al.*, 2002) agit comme un co-activateur de SREBP1 (Dooley *et al.*, 1999).

Cette dernière expérience nous apporte une information supplémentaire et précieuse car elle corrèle le taux de glucose dans les 3T3-L1 à l'activation d'un facteur de transcription connu pour contrôler l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*. Par ce type d'expérience crucial, nous devrions après confirmation et recherche de l'effet du FCCP, pouvoir comprendre le rôle du glucose dans l'apparition du phénotype « adipocyte-like » suite à l'accumulation de TAG induite chez des pré-adipocytes en culture soumis à des inhibiteurs de la chaîne respiratoire tels que l'antimycine A, la stigmatelline, le myxothiazol et la roténone. Cette expérience devrait également nous donner des éléments de réponse permettant de comprendre comment et pourquoi certains inhibiteurs de phosphorylations oxydatives mitochondriales tels que le FCCP ne conduisent pas à ce phénotype.

#### **IV Conclusions et perspectives**

L'obésité est caractérisée par une accumulation excessive de tissu adipeux et est souvent associée à des pathologies comme le diabète de type II, l'hypertension et des maladies cardiovasculaires. De plus, elle met en jeu de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas toujours de comprendre ni d'identifier les causes conduisant à l'obésité. En effet, les mécanismes moléculaires, cellulaires et systémiques régulant la quantité de tissu adipeux d'un individu sont très complexes et encore peu compris.

Au niveau cellulaire, l'obésité se caractérise par une hypertrophie et/ou une hyperplasie des adipocytes. Si les mécanismes impliqués dans la différenciation des adipoblastes en adipocytes (=adipogenèse) sont de mieux en mieux décrits, le rôle potentiel joué par les organites comme la mitochondrie, est peu étudié. Cependant, cette dernière constitue une cible appropriée dans l'étude du programme de différenciation puisqu'elle gère en grande partie, le métabolisme énergétique par les voies de la  $\beta$ -oxydation et des phosphorylations oxydatives qui mènent à la production d'ATP. De plus, la mitochondrie est le siège de la localisation des protéines de découplage (UCPs), dont le rôle dans l'adipogenèse est encore peu connu (Ricquier *et al.*, 2000).

Sur base des résultats obtenus par Anould *et al.* (2002), qui rapportent qu'un dysfonctionnement mitochondrial est associé, dans certains types cellulaires, à une augmentation d'activité du facteur de transcription CREB (également impliqué dans l'adipogenèse), nous avons développé une recherche, au laboratoire, qui porte sur la réponse de pré-adipocytes 3T3-L1 à une inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales (Arnould *et al.*, 2002).

L'étude de la conversion de pré-adipocytes en adipocytes matures ou de l'accumulation de TAG (triacylglycérols) induite par une inhibition mitochondriale peut être abordée par différentes approches : la recherche des voies d'activation de kinases, l'étude de l'activation de facteurs de transcription impliqués ainsi que leurs interactions éventuelles, la recherche des changements d'expression de gènes associés à l'apparition des phénotypes, et l'étude des flux de substrats énergétiques tels que les acides gras et le glucose. C'est cette dernière approche que nous avons utilisée. En effet, l'objectif principal de notre travail était d'étudier les mécanismes responsables de l'accumulation de TAG, dans les cellules, induite par une

inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales, en étudiant l'incorporation et le devenir de ces substrats énergétiques.

Des travaux antérieurs à notre étude menés au laboratoire ont montré que l'inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales par l'antimycine A induit l'apparition d'un phénotype "adipocyte-like" caractérisé par l'accumulation de nombreuses petites vésicules de TAG. Par contre, l'agent découplant (FCCP) n'a aucune influence sur le phénotype cellulaire. Nous avons alors comparé les mécanismes moléculaires menant au phénotype cellulaire "adipocyte-like", induit par un stress énergétique en présence d'antimycine A, à ceux impliqués dans le processus d'adipogenèse induit par un protocole standard de différenciation.

Nous avons travaillé sur des cellules 3T3-L1 qui constituent un modèle de référence idéal pour étudier l'effet d'un stress énergétique sur le processus adipogénique. En effet, ces cellules sont couramment utilisées dans l'étude du processus d'adipogenèse induite *in vitro* par une stimulation en présence d'insuline, d'agents capables d'augmenter la concentration intracellulaire en AMPc et de glucocorticoïdes.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'importance du rôle joué par les acides gras dans l'accumulation de vésicules de TAG observées dans les deux modèles étudiés. Différentes techniques nous ont permis d'étudier le métabolisme des acides gras à deux niveaux : leur transport à travers la membrane plasmique ainsi que leur  $\beta$ -oxydation mitochondriale.

Par une mesure d'incorporation des acides gras, nous avons montré que les cellules 3T3-L1 traitées à l'antimycine A incorporent moins d'acide gras que des cellules contrôles. Par contre, la différenciation induite par les molécules pro-adipogènes s'accompagne d'une augmentation de l'incorporation des acides gras à travers la membrane plasmique. Cette incorporation est corrélée dans le temps à l'accumulation des vésicules de TAG (jours 3-4).

D'autre part, nous nous sommes intéressés à la voie de dégradation de ces acides gras en comparant le taux de  $\beta$ -oxydation dans nos différentes conditions expérimentales. Les deux modèles qui se caractérisent par l'apparition de vésicules de TAG (cellules traitées à l'AA et traitées avec le cocktail MIX 3) présentent également un taux de  $\beta$ -oxydation plus faible. Par contre, le FCCP, qui n'induit pas l'apparition de vésicules de TAG, engendre également une augmentation de la  $\beta$ -oxydation dans les cellules.

Ces résultats intéressants suggèrent que la présence de vésicules lipidiques qui caractérisent le phénotype adipocytaire et "adipocyte-like" pourraient résulter, au moins



partiellement, d'une diminution d'activité de la voie catabolique de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

C'est pourquoi, dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux éléments qui régulent l'entrée des acides gras dans la mitochondrie par le système CPT. Nous avons d'abord comparé les taux de transcrits des différentes isoformes de la CPT (L-CPT1, M-CPT1 et la CPT2), par la technique de "real time PCR", avec un intérêt particulier pour la CPT1, considérée comme l'étape limitante de l'incorporation des acides gras dans la mitochondrie. Il ressort de ces expériences qu'une inhibition chronique des phosphorylations oxydatives par l'antimycine A entraîne une diminution importante de l'abondance d'ARNm codant pour les isoformes M-CPT1 et L-CPT1 (diminutions respectives de 60 % et 40 %). Ce phénomène est également observé dans les adipocytes matures (diminutions de 25 % pour M-CPT1 et 80 % pour L-CPT1).

Cependant, cette diminution de la quantité de transcrits observée pour les cellules traitées à l'antimycine A, n'est pas corrélée à une diminution de l'activité de la CPT1 que nous avons mesurée sur des extraits cellulaires enrichis en mitochondries. Pour tenter de comprendre ces résultats divergents, il faudrait tenir compte d'une part de l'abondance de la protéine qui pourrait être estimée par la technique du Western blot et d'autre part, des mécanismes intracellulaires de régulation. En effet, si l'on tient compte d'une étude, également menée au laboratoire qui rapporte que l'activité de l'AMPK est augmentée en condition d'inhibition mitochondriale, on peut penser que l'activité de la CPT1 pourrait être augmentée par une levée de l'inhibition qu'exerce le malonyl-CoA sur cette enzyme. En effet, l'activité de l'AMPK conduit à une diminution du malonyl-CoA par l'inhibition de l'ACC (Muoio *et al.*, 1999). Ces expériences devraient néanmoins être répétée afin de confirmer leur validité. Au vu de ces résultats préliminaires, nous proposons que la diminution de  $\beta$ -oxydation mesurée dans les cellules présentant le phénotype "adipocyte-like", ainsi que dans les adipocytes matures, contribue à l'apparition de vésicules de TAG.

Nos résultats semblent cependant indiquer que le stockage de TAG dans les cellules traitées par l'antimycine A et le MIX 3, bien que corrélés à une diminution de la  $\beta$ -oxydation résultent de mécanismes différents. En effet, étant donné l'effet totalement différent de ces traitements sur l'incorporation des acides gras, nous avons donc recherché l'effet de ces traitements sur l'incorporation d'un autre substrat énergétique, le glucose.

Le second volet de notre étude s'intéresse donc au rôle éventuel du glucose dans l'apparition de vésicules de TAG. Par une mesure d'incorporation du traceur 2-déoxy-[1, 2-

<sup>3</sup>H]-D-glucose dans nos différentes conditions expérimentales, nous avons montré que les cellules soumises à une inhibition mitochondriale en présence d'antimycine A incorporent une quantité élevée de glucose, contrairement aux cellules en différenciation et traitées avec le FCCP. Ajoutons également que cette importante augmentation d'incorporation de glucose se passe de manière rapide et soutenue.

Rappelons que le transport du glucose à travers la membrane plasmique est assuré par des transporteurs spécifiques (GLUTs), et que la littérature rapporte que les isoformes GLUT1 et GLUT4 sont essentiellement exprimées dans les adipocytes (Joost *et al.*, 2001). Ajoutons que GLUT4, qui est séquestré dans des vésicules de stockage, est transloqué en membrane plasmique en réponse à l'insuline et que cette translocation, est médiée par différentes voies de signalisation dont celle de la PI3-kinase.

Afin de chercher à savoir si le transporteur GLUT responsable de l'augmentation d'incorporation de glucose stimulée par l'antimycine A, nous nous sommes intéressés à l'expression de GLUT1 et GLUT4 en membrane plasmique.

Nous avons également recherché l'activation de la translocation de GLUT4 pouvait également être induite par un stress énergétique mitochondrial chronique en présence d'antimycine A.

La technique de marquage en immunofluorescence et l'observation en microscopie confocale, nous a permis de visualiser l'abondance des isoformes GLUT1 et GLUT4 exprimés en membrane plasmique. Les résultats suggèrent que l'antimycine A induit l'expression de GLUT4 en membrane plasmique et que c'est principalement par ce transporteur que des cellules 3T3-L1 incorporent le glucose dans ces conditions. En effet, l'augmentation de l'incorporation de 2-déoxy-[1, 2-<sup>3</sup>H]-D-glucose, réalisée par des cellules 3T3-L1 traitées avec l'antimycine A est diminuée en présence de deux inhibiteurs de la PI3-kinase, le LY 29 4002 et la wortmannine. Ceci est corroboré par une visualisation des isoformes GLUTs en microscopie confocale qui a montré que les inhibiteurs de la PI3-kinase provoquent une diminution de l'abondance de GLUT4 en membrane plasmique, suite à une incubation des cellules en présence d'antimycine A..

Ces résultats montrent clairement que, suite à une inhibition mitochondriale par l'antimycine A, les cellules 3T3-L1 incorporent essentiellement du glucose et non des acides gras. Cette prise en charge est assurée par le transporteur GLUT4 dont la translocation en membrane plasmique est activée par la voie de la PI3-kinase..

Enfin, nous avons recherché le rôle éventuel du glucose sur l'activation d'un facteur de transcription connu pour participer au contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse de novo, tels que l'ACC et la FAS (Kawaguchi *et al.*, 2001). Nous avons abordé cette question en étudiant l'effet de l'antimycine A sur l'activation de SREBP1. En effet, on retrouve la présence de la séquence consensus de ce facteur, SRE (Sterol Responsive Element), dans les promoteurs de nombreux gènes de la lipogenèse (Foretz *et al.*, 1999b). En utilisant la technique de transfection transitoire et un système rapporteur, nous avons montré qu'après 24 h d'inhibition de l'activité mitochondriale par l'antimycine A, l'activité transcriptionnelle du facteur SREBP1 est augmentée. Néanmoins, ces résultats préliminaires doivent être complétés et confirmés.

Nous suggérons à partir de l'ensemble de nos expériences que l'antimycine A induit l'apparition du phénotype "adipocyte-like" dans le modèle cellulaire 3T3-L1, caractérisé par une accumulation de TAG, par une action conjointe d'une augmentation de l'incorporation de glucose et également par une diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Nos résultats montrent également que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition des vésicules de TAG dans le phénotype "adipocyte-like" diffèrent de ceux qui participent à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures. La figure 4.1 synthétise les informations obtenues au cours de ce travail.

Ce travail est innovant par le fait qu'il associe un dysfonctionnement mitochondrial à l'accumulation de TAG dans la cellule. Mentionnons également qu'il a été montré très récemment par Huss *et al.* que des cardiomyocytes en conditions de stress énergétique (hypoxie) présentent un phénotype comparable à notre modèle "adipocyte-like" (Huss *et al.*, 2001).

Les multiples perspectives de ce travail sont énoncées ci-dessous.

Le premier aspect, qui mériterait d'être approfondi, est celui de la voie de biosynthèse des acides gras. En effet, nous nous sommes uniquement attaché dans cette problématique, à la voie de dégradation des acides gras par la  $\beta$ -oxydation. Cependant, notre accumulation de TAG est probablement le résultat d'un déséquilibre entre la voie de biosynthèse et de dégradation de ceux-ci. C'est pourquoi l'étude de cette voie de synthèse apporterait des renseignements complémentaires à notre compréhension sur l'apparition et le maintien de vésicules de TAG caractérisant le phénotype "adipocyte-like". Une analyse de l'expression de gènes dans ces conditions permettrait d'identifier les gènes éventuellement surexprimés et participant à la synthèse de ces TAG.

Ajoutons qu'une "adipo-chips" permettant l'étude des changements d'expression d'une cinquantaine de gènes impliqués dans le processus de différenciation cellulaire des 3T3-L1, est actuellement en cours de développement au laboratoire. Il sera donc possible de quantifier et de comparer l'expression de ces gènes dans nos différents modèles, nous pourrions également rechercher les profils d'expression de gènes dans des conditions expérimentales où l'on priverait la cellule de glucose pendant de courtes périodes.

D'autre part, des études supplémentaires portant sur l'activation du facteur de transcription SREBP1 et l'activation d'autres facteurs de transcription tels que ChREBP (Carbohydrate Responsive-Element Binding Protein) participant à l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse *de novo* et qui répondent au glucose, pourraient permettre d'élucider les mécanismes précis de la synthèse des acides gras à partir de la molécule de glucose et d'identifier les facteurs de transcription impliqués..

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le glucose participerait à la synthèse et à l'accumulation des TAG dans des cellules dont les phosphorylations oxydatives sont inhibées par l'antimycine A, nous pourrions également suivre le devenir métabolique du glucose en TLC (Thin Layer Chromatography), en utilisant du glucose marqué par l'isotope  $^{14}\text{C}$  et en recherchant la radioactivité éventuellement associée aux molécules lipidiques néosynthétisées. Cette technique devrait donc nous apporter des informations sur la contribution du glucose dans la formation des lipides cellulaires comme les TAG.

Enfin, une perspective à plus long terme serait d'utiliser d'autres types cellulaires et non adipeux tels que des hépatocytes ou des cardiomyocytes. En effet, nous avons utilisé dans notre étude, des cellules prédestinées à accumuler des TAG. Cependant, il serait très intéressant d'utiliser ces types cellulaires afin de confirmer les mécanismes mis en évidence dans notre modèle et de mieux comprendre le phénomène de lipotoxycité qui sous-tend de nombreux processus physiopathologiques associés à l'obésité tel que le diabète de type II

## ***V Bibliographie***

- Abumrad N., C. Harmon *et al.*, *Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process*, J Lipid Res, 39, 2309-18., 1998.
- Arnould T., S. Vankoningsloo *et al.*, *CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation*, Embo J, 21, 53-63, 2002.
- Barsh G. S., I. S. Farooqi *et al.*, *Genetics of body-weight regulation*, Nature, 404, 644-51, 2000.
- Bell G. I. and K. S. Polonsky, *Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function*, Nature, 414, 788-91, 2001.
- Bennett M. K., J. M. Lopez *et al.*, *Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways*, J Biol Chem, 270, 25578-83., 1995.
- Berg A. H., T. P. Combs *et al.*, *The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*, Nat Med, 7, 947-53, 2001.
- Bergman R. N. and M. Ader, *Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*, Trends Endocrinol Metab, 11, 351-6., 2000.
- Bevan P., *Insulin signalling*, J Cell Sci, 114, 1429-30., 2001.
- Bonen A., J. J. Luiken *et al.*, *Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase*, J Biol Chem, 275, 14501-8., 2000.
- Bouillaud F., I. Arechaga *et al.*, *A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein*, Embo J, 13, 1990-7., 1994.
- Bradford M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem, 72, 248-54., 1976.
- Brady P. S., E. A. Park *et al.*, *Isolation and characterization of the promoter for the gene coding for the 68 kDa carnitine palmitoyltransferase from the rat*, Biochem J, 286, 779-83., 1992.
- Brown N. F., J. K. Hill *et al.*, *Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes*, Biochem J, 327 ( Pt 1), 225-31, 1997.
- Buren J., H. X. Liu *et al.*, *Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3- kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes*, Eur J Endocrinol, 146, 419-29, 2002.
- Caserta F., T. Tchkonja *et al.*, *Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 280, E238-47., 2001.
- Chavin K. D., S. Yang *et al.*, *Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion*, J Biol Chem, 274, 5692-700., 1999.
- Chien D., D. Dean *et al.*, *Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 279, E259-65., 2000.
- Cianflone K., *Acylation stimulating protein and the adipocyte*, J Endocrinol, 155, 203-6, 1997.
- Clapham J. C., J. R. Arch *et al.*, *Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean*, Nature, 406, 415-8., 2000.

- Cohen P., *The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 354, 485-95., 1999.
- Cornelius P., O. A. MacDougald *et al.*, *Regulation of adipocyte development*, Annu Rev Nutr, 14, 99-129, 1994.
- Davies S. P., D. Carling *et al.*, *Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay*, Eur J Biochem, 186, 123-8., 1989.
- Delbart, *Les mitochondries : biologie et incidences physiopathologiques*, 2000.
- Dooley K. A., M. K. Bennett *et al.*, *A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A synthase promoter*, J Biol Chem, 274, 5285-91, 1999.
- Duplus E., M. Glorian *et al.*, *Fatty acid regulation of gene transcription*, J Biol Chem, 275, 30749-52, 2000.
- Dutta-Roy A. K., *Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins*, Cell Mol Life Sci, 57, 1360-72, 2000.
- Eaton S., *Control of mitochondrial beta-oxidation flux*, Prog Lipid Res, 41, 197-239., 2002.
- Ericsson J. and P. A. Edwards, *CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element- binding protein-regulated transcription*, J Biol Chem, 273, 17865-70., 1998.
- Esser V., N. F. Brown *et al.*, *Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes*, J Biol Chem, 271, 6972-7., 1996.
- Foretz M., C. Guichard *et al.*, *Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis- related genes*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 12737-42., 1999a.
- Foretz M., C. Pacot *et al.*, *ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose*, Mol Cell Biol, 19, 3760-8., 1999b.
- Friedman J., *Fat in all the wrong places*, Nature, 415, 268-9, 2002.
- Friedman J. M., *Obesity in the new millennium*, Nature, 404, 632-4, 2000.
- Frohnert B. I., T. Y. Hui *et al.*, *Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene*, J Biol Chem, 274, 3970-7, 1999.
- Gargiulo C. E., S. M. Stuhlsatz-Krouper *et al.*, *Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane*, J Lipid Res, 40, 881-92., 1999.
- Grimaldi P. A., L. Teboul *et al.*, *Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones*, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 57, 71-5., 1997.
- Grimes C. A. and R. S. Jope, *CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium*, J Neurochem, 78, 1219-32., 2001.
- Guilherme A., M. Emoto *et al.*, *Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 275, 38151-9., 2000.
- Hamann A., J. S. Flier *et al.*, *Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia*, Endocrinology, 137, 21-9., 1996.

- Hansen J. B., R. K. Petersen *et al.*, *Deregulated MAPK activity prevents adipocyte differentiation of fibroblasts lacking the retinoblastoma protein*, J Biol Chem, 8, 8, 2002.
- Hardie D. G., J. Corton *et al.*, *Regulation of lipid metabolism by the AMP-activated protein kinase*, Biochem Soc Trans, 25, 1229-31., 1997.
- Hasty A. H., H. Shimano *et al.*, *Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level*, J Biol Chem, 275, 31069-77., 2000.
- Hayashi T., M. F. Hirshman *et al.*, *Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism*, Diabetes, 49, 527-31, 2000.
- Heart E., W. S. Choi *et al.*, *Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 278, E103-12., 2000.
- Houglum K., K. S. Lee *et al.*, *Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on serine 133*, J Clin Invest, 99, 1322-8., 1997.
- Houseknecht K. L., B. M. Cole *et al.*, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: A review*, Domest Anim Endocrinol, 22, 1-23., 2002.
- Huang J., T. Imamura *et al.*, *Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 13084-9., 2001.
- Huss J. M., F. H. Levy *et al.*, *Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O<sub>2</sub>-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation*, J Biol Chem, 276, 27605-12., 2001.
- Inuzuka H., R. Nanbu-Wakao *et al.*, *Differential regulation of immediate early gene expression in preadipocyte cells through multiple signaling pathways*, Biochem Biophys Res Commun, 265, 664-8., 1999.
- Ishibashi K., T. Imamura *et al.*, *The acute and chronic stimulatory effects of endothelin-1 on glucose transport are mediated by distinct pathways in 3T3-L1 adipocytes*, Endocrinology, 141, 4623-8., 2000.
- Joost H. G. and B. Thorens, *The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review)*, Mol Membr Biol, 18, 247-56., 2001.
- Jump D. B., A. Thelen *et al.*, *Dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic gene expression*, Lipids, 34, S209-12., 1999.
- Kamon J., T. Naitoh *et al.*, *Prostaglandin F(2)alpha enhances glucose consumption through neither adipocyte differentiation nor GLUT1 expression in 3T3-L1 cells*, Cell Signal, 13, 105-9., 2001.
- Kang J., E. Heart *et al.*, *Effects of cellular ATP depletion on glucose transport and insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 280, E428-35., 2001.
- Kanzaki M. and J. E. Pessin, *Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling*, J Biol Chem, 276, 42436-44., 2001.
- Karp G., *Biologie cellulaire et moléculaire, concepts et expériences*, in D. B. Université (Eds), De Boeck Université, 1998.
- Kawaguchi T., M. Takenoshita *et al.*, *Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 13710-5., 2001.

- Kim J. B. and B. M. Spiegelman, *ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism*, Genes Dev, 10, 1096-107., 1996.
- Kim J. B., H. M. Wright *et al.*, *ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 4333-7., 1998.
- Klemm D. J., J. W. Leitner *et al.*, *Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation*, J Biol Chem, 276, 28430-5., 2001.
- Kliewer S. A., J. M. Lenhard *et al.*, *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*, Cell, 83, 813-9., 1995.
- Klingenberg M. and E. Winkler, *The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H<sup>+</sup> translocator*, Embo J, 4, 3087-92., 1985.
- Klingenberg M., E. Winkler *et al.*, *Uncoupling protein, H<sup>+</sup> transport and regulation*, Biochem Soc Trans, 29, 806-11., 2001.
- Koopman R., G. Schaart *et al.*, *Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids*, Histochem Cell Biol, 116, 63-8., 2001.
- Kudo N., A. J. Barr *et al.*, *High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase*, J Biol Chem, 270, 17513-20., 1995.
- Laemmli U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, 227, 680-5., 1970.
- Lane M. D., P. A. Watkins *et al.*, *Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase activity in the liver cell*, CRC Crit Rev Biochem, 7, 121-41., 1979.
- Latasa M. J., Y. S. Moon *et al.*, *Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element*, Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 10619-24., 2000.
- Lee M. Y., H. J. Kong *et al.*, *Regulation of activating transcription factor-2 in early stage of the adipocyte differentiation program*, Biochem Biophys Res Commun, 281, 1241-7, 2001.
- Lehmann J. M., L. B. Moore *et al.*, *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*, J Biol Chem, 270, 12953-6., 1995.
- Lodish, *biologie moléculaire de la cellule*, DeBoeck Université, 1997.
- Loike J. D., L. Cao *et al.*, *Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells*, Am J Physiol, 263, C326-33., 1992.
- MacDougald O. A. and M. D. Lane, *Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation*, Annu Rev Biochem, 64, 345-73, 1995.
- Mastick C. C. and A. R. Saltiel, *Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells*, J Biol Chem, 272, 20706-14., 1997.
- McGarry J. D., S. E. Mills *et al.*, *Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat*, Biochem J, 214, 21-8., 1983.
- Michael M. D., R. N. Kulkarni *et al.*, *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction*, Mol Cell, 6, 87-97., 2000.



- Millar C. A., A. Shewan *et al.*, *Differential regulation of secretory compartments containing the insulin-responsive glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes*, Mol Biol Cell, 10, 3675-88., 1999.
- Minokoshi Y., Y. B. Kim *et al.*, *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*, Nature, 415, 339-43., 2002.
- Moon Y. A., N. A. Shah *et al.*, *Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins*, J Biol Chem, 276, 45358-66., 2001.
- Moore F., J. Weekes *et al.*, *Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion*, Eur J Biochem, 199, 691-7., 1991.
- Morin C., R. Zini *et al.*, *Low glucocorticoid concentrations decrease oxidative phosphorylation of isolated rat brain mitochondria: an additional effect of dexamethasone*, Fundam Clin Pharmacol, 14, 493-500., 2000.
- Mourrieras F., F. Foufelle *et al.*, *Induction of fatty acid synthase and S14 gene expression by glucose, xylitol and dihydroxyacetone in cultured rat hepatocytes is closely correlated with glucose 6-phosphate concentrations*, Biochem J, 326, 345-9., 1997.
- Muoio D. M., K. Seefeld *et al.*, *AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol- 3-phosphate acyltransferase is a novel target*, Biochem J, 338, 783-91., 1999.
- Myers M. G., Jr., J. M. Backer *et al.*, *IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85*, Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 10350-4., 1992.
- Nedergaard J., V. Golozubova *et al.*, *UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency*, Biochim Biophys Acta, 1504, 82-106., 2001.
- Ntambi J. M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*, J Nutr, 130, 3122S-3126S, 2000.
- Nugent C., J. B. Prins *et al.*, *Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. Evidence for involvement of lipoxygenase metabolites and peroxisome proliferator- activated receptor gamma*, J Biol Chem, 276, 9149-57, 2001.
- Nystrom F. H., H. Chen *et al.*, *Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells*, Mol Endocrinol, 13, 2013-24., 1999.
- Okamoto T., A. Schlegel *et al.*, *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane*, J Biol Chem, 273, 5419-22., 1998.
- Orena S. J., A. J. Torchia *et al.*, *Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 275, 15765-72., 2000.
- Patel Y. M. and M. D. Lane, *Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain- mediated turnover of p27*, J Biol Chem, 275, 17653-60., 2000.
- Pessin J. E., D. C. Thurmond *et al.*, *Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!*, J Biol Chem, 274, 2593-6., 1999.
- Pfaffl M. W., T. M. Georgieva *et al.*, *Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species*, Domest Anim Endocrinol, 22, 91-102., 2002.
- Prins J. B. and S. O'Rahilly, *Regulation of adipose cell number in man*, Clin Sci (Lond), 92, 3-11., 1997.

- Qiu Z., Y. Wei *et al.*, *DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes*, J Biol Chem, 276, 11988-95., 2001.
- Raha S., G. E. McEachern *et al.*, *Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase*, Free Radic Biol Med, 29, 170-80., 2000.
- Reusch J. E., L. A. Colton *et al.*, *CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells*, Mol Cell Biol, 20, 1008-20, 2000.
- Rial E., M. Gonzalez-Barroso *et al.*, *Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2*, Embo J, 18, 5827-33., 1999.
- Ribon V., J. H. Johnson *et al.*, *Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 14751-6., 1998.
- Ricquier D. and F. Bouillaud, *Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance*, J Physiol, 529 Pt 1, 3-10., 2000.
- Ros-Baro A., C. Lopez-Iglesias *et al.*, *Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 12050-5., 2001.
- Ruan H. and H. J. Pownall, *Overexpression of 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase-alpha enhances lipid storage in cellular models of adipose tissue and skeletal muscle*, Diabetes, 50, 233-40., 2001.
- Rudich A., A. Tirosh *et al.*, *Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*, Diabetes, 47, 1562-9., 1998.
- Sakai J., A. Nohturfft *et al.*, *Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies*, J Biol Chem, 273, 5785-93., 1998.
- Sakoda H., T. Ogiwara *et al.*, *Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction*, Diabetes, 49, 1700-8., 2000.
- Saltiel A. R., *You are what you secrete*, Nat Med, 7, 887-8, 2001.
- Saltiel A. R. and C. R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*, Nature, 414, 799-806, 2001.
- Sato R., J. Inoue *et al.*, *Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2*, J Biol Chem, 271, 26461-4., 1996.
- Scherer P. E., R. Y. Lewis *et al.*, *Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo*, J Biol Chem, 272, 29337-46., 1997.
- Schwartz M. W., S. C. Woods *et al.*, *Central nervous system control of food intake*, Nature, 404, 661-71, 2000.
- Sessler A. M. and J. M. Ntambi, *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression*, J Nutr, 128, 923-6., 1998.
- Shimano H., I. Shimomura *et al.*, *Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene*, J Clin Invest, 100, 2115-24., 1997.
- Smas C. M., L. Chen *et al.*, *Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation*, J Biol Chem, 274, 12632-41, 1999.
- Smith P. J., L. S. Wise *et al.*, *Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 263, 9402-8., 1988.

- Stephens J. M., J. Lee *et al.*, *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction*, J Biol Chem, 272, 971-6, 1997.
- Steppan C. M., S. T. Bailey *et al.*, *The hormone resistin links obesity to diabetes*, Nature, 409, 307-12, 2001.
- Streicher R., J. Kotzka *et al.*, *SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I*, J Biol Chem, 271, 7128-33., 1996.
- Student A. K., R. Y. Hsu *et al.*, *Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes*, J Biol Chem, 255, 4745-50., 1980.
- Takahashi N., T. Kawada *et al.*, *Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators, CREB binding protein (CBP) and p300, revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)*, J Biol Chem, 2002.
- Tang Q. Q. and M. D. Lane, *Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation*, Genes Dev, 13, 2231-41., 1999.
- Tao Y., K. Cianflone *et al.*, *Acylation-stimulating protein (ASP) regulates glucose transport in the rat L6 muscle cell line*, Biochim Biophys Acta, 1344, 221-9., 1997.
- Thomson M. J., M. G. Williams *et al.*, *Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 272, 7759-64, 1997.
- Thumelin S., C. Kohl *et al.*, *Atypical expression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in subcutaneous adipose tissue of male rats*, J Lipid Res, 40, 1071-7., 1999.
- Timchenko N. A., T. E. Harris *et al.*, *CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice*, Mol Cell Biol, 17, 7353-61., 1997.
- Tirosh A., A. Rudich *et al.*, *Oxidative stress impairs insulin but not platelet-derived growth factor signalling in 3T3-L1 adipocytes*, Biochem J, 355, 757-63., 2001.
- Tontonoz P., R. A. Graves *et al.*, *Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha*, Nucleic Acids Res, 22, 5628-34., 1994.
- Towle H. C., *Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 13476-8., 2001.
- Ubeda M., X. Z. Wang *et al.*, *Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element*, Mol Cell Biol, 16, 1479-89., 1996.
- Usui I., T. Haruta *et al.*, *Retinoblastoma protein phosphorylation via PI 3-kinase and mTOR pathway regulates adipocyte differentiation*, Biochem Biophys Res Commun, 275, 115-20., 2000.
- Valverde A. M., M. Lorenzo *et al.*, *Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes*, Mol Endocrinol, 11, 595-607, 1997.
- Vasseur-Cognet M. and M. D. Lane, *CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) undifferentiated protein: a developmentally regulated nuclear protein that binds to the C/EBP alpha gene promoter*, Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 7312-6., 1993.
- Vavvas D., A. Apazidis *et al.*, *Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP- activated kinase in skeletal muscle*, J Biol Chem, 272, 13255-61., 1997.

- Wang H., P. Iakova *et al.*, *C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4*, Mol Cell, 8, 817-28., 2001.
- Watson R. T. and J. E. Pessin, *Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin- responsive glucose transporter, GLUT4*, Exp Cell Res, 271, 75-83., 2001.
- Whitehead J. P., J. C. Molero *et al.*, *The role of Ca<sup>2+</sup> in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 cells*, J Biol Chem, 276, 27816-24., 2001.
- Woods A., D. Azzout-Marniche *et al.*, *Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase*, Mol Cell Biol, 20, 6704-11., 2000.
- Worgall T. S., S. L. Sturley *et al.*, *Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein*, J Biol Chem, 273, 25537-40., 1998.
- Xu H. E., M. H. Lambert *et al.*, *Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator- activated receptors*, Mol Cell, 3, 397-403, 1999.
- Yamauchi T., J. Kamon *et al.*, *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity*, Nat Med, 7, 941-6, 2001.
- Yip R. G. and M. M. Wolfe, *GIP biology and fat metabolism*, Life Sci, 66, 91-103, 2000.
- Zimmerman A. W. and J. H. Veerkamp, *Fatty-acid-binding proteins do not protect against induced cytotoxicity in a kidney cell model*, Biochem J, 360, 159-65., 2001.

---

I Introduction.....	1
I.1 L'obésité.....	1
I.1.1 Généralités.....	1
I.1.2 Facteurs influençant l'obésité.....	1
I.1.2.1 Facteurs génétiques.....	2
I.1.2.2 Autres facteurs associés .....	2
I.1.3 Le tissu adipeux.....	2
I.1.4 Le tissu adipeux en tant que glande endocrine.....	3
I.2 L'adipogenèse .....	5
I.2.1 Caractérisation morphologique de la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes blancs .....	5
I.2.2 Caractérisation moléculaire de la différenciation de pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes blancs en culture .....	6
I.2.2.1 Succession des évènements du programme de différenciation de la lignée cellulaire 3T3-L1 .....	6
I.2.2.2 Les inducteurs de l'adipogenèse dans le type cellulaire 3T3-L1.....	8
I.2.2.2.a L'insuline et l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1) .....	8
I.2.2.2.b Les glucocorticoïdes.....	8
I.2.2.2.c Les agents augmentant la concentration en AMPc .....	8
I.2.2.3 Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 .....	9
I.2.2.3.a CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs).....	9
I.2.2.3.b Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor1/ Sterol Regulatory Element Binding Protein (ADD1/SREBP1).....	10
I.2.2.3.c Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs).....	11
I.2.2.3.d CAMP-Response Element Binding Protein (CREB).....	12
I.3 Le métabolisme du glucose.....	13
I.3.1 Biosynthèse et sécrétion de l'insuline.....	13
I.3.2 Actions tissu spécifique de l'insuline .....	13
I.3.3 Les transporteurs de glucose .....	14
I.3.4 Voies de signalisation médiées par l'insuline .....	14
I.3.4.1 La voie de la PI3-kinase .....	15
I.3.4.2 La voie des Cbl/CAP.....	16
I.3.4.3 La voie des MAP kinases .....	16

---

---

I.3.5 Métabolisme du glucose et importance de la mitochondrie.....	17
I.3.5.1 Rôle de la mitochondrie dans le métabolisme du glucose .....	17
I.3.5.1.a La chaîne de transporteurs d'électrons .....	17
I.3.5.1.b Force protomotrice et la Fo-F1 ATP Synthase .....	18
I.3.5.1.c Les agents découplants .....	19
I.3.6 Les facteurs de transcription activés par le glucose .....	20
I.4 Métabolisme des acides gras.....	21
I.4.1 Les lipides : classification .....	21
I.4.2 Digestion, métabolisation et transport sanguin des lipides .....	22
I.4.3 Transport des acides gras à travers les membranes biologiques .....	22
I.4.4 Métabolisme lipidique dans le tissu adipeux .....	24
I.4.4.1 La lipogenèse et synthèse des TAG .....	24
I.4.4.2 Lipolyse.....	25
I.4.5 La $\beta$ -oxydation mitochondriale .....	26
I.4.6 Régulation du métabolisme des acides gras.....	26
I.4.6.1 Régulation à court terme .....	26
I.4.6.2 Régulation à long terme : régulation de l'expression génique par les acides gras.....	27
I.4.6.2.a Régulation négative.....	28
I.4.6.2.b Régulation positive.....	28
II Matériels et méthodes. ....	33
II.1 Culture cellulaire et sous-cultures.....	33
II.1.1 Culture : .....	33
II.1.2 Méthodes des sous-cultures : .....	33
II.2 Différenciation et incubations des cellules avec les inhibiteurs mitochondriaux .....	34
II.2.1 Programme de différenciation des cellules 3T3-L1 : .....	34
II.2.2 Traitement chronique des cellules 3T3-L1 avec les inhibiteurs de l'activité mitochondriale : .....	34
II.3 Coloration des triacylglycérols à l'Oil Red O. ....	34
II.4 Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. ....	35
II.4.1 Principe.....	35
II.4.2 Méthode : .....	36
II.4.2.1 Sous-culture et incubations : .....	36

---

---

II.4.2.2 Précipitation et mesure de la radioactivité associée .....	36
II.5 Mesure de l'incorporation de 2-déoxy-D-glucose tritié.....	37
II.5.1 Principe : .....	37
II.5.2 Méthode .....	37
II.5.2.1 Sous- culture et incubations .....	37
II.5.2.2 Lyse et dosage : .....	38
II.6 Western blotting .....	38
II.6.1 Principe : .....	39
II.6.2 Méthodes : .....	39
II.6.2.1 Sous-cultures et préparation des lysats clairs : .....	39
II.6.2.2 Préparation des échantillons : .....	40
II.6.2.3 Préparation des gels SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et migration : .....	40
II.6.2.4 Transfert sur membrane de PVDF : .....	41
II.6.2.5 Incubations de la membrane avec les anticorps et révélation : .....	41
II.7 Marquage des isoformes GLUT1 et GLUT4 et visualisation en microscopie confocale .....	42
II.7.1 Principe : .....	42
II.7.2 Méthodes : .....	42
II.7.2.1 Sous-culture et incubations : .....	42
II.7.2.2 Marquage de GLUT1 et GLUT4 : .....	43
II.8 Réaction d'amplification en chaîne en temps réel (Real Time PCR) .....	43
II.8.1 Principe .....	44
II.8.2 Méthode .....	44
II.8.2.1 Sous cultures, incubations et extraction des ARN totaux .....	44
II.8.2.2 Recherche du couple de primers à partir de la séquence d'ARN messenger .....	45
II.8.2.3 La reverse transcription (RT) .....	45
II.8.2.4 Détermination de la concentration en primers .....	46
II.8.2.5 Détermination de la courbe de dilutions .....	46
II.8.2.6 Quantification de l'expression des gènes M-CPT1 et L-CPT1 et CPT2 .....	46
II.8.2.7 Analyse des résultats.....	47

---

---

II.9 Mesure de l'incorporation de glycérol tritié ([ <sup>3</sup> H]-glycérol) et d'oléate marqué au carbone-14 ([ <sup>14</sup> C]-oléate).....	47
II.9.1 Principe.....	47
II.9.2 Méthode.....	48
II.10 Transfection et système rapporteur luciférase.....	48
II.10.1 Principe.....	48
II.10.1.1 Transfection des 3T3-L1 par le Superfect Transfection Reagent (Qiagen).....	49
II.10.1.2 Dosage des activités luciférase et β-galactosidase.....	49
II.10.2 Méthode.....	50
II.10.2.1 Sous-culture.....	50
II.10.2.2 Transfection.....	50
II.10.2.3 Dosages.....	51
II.10.2.3.a Lyse cellulaire.....	51
II.10.2.3.b Dosage de la luciférase.....	51
II.10.2.3.c Dosage de la β-galactosidase.....	51
II.11 Mesure de la β-oxydation des acides gras dans des cellules 3T3-L1.....	51
II.11.1 Principe.....	52
II.11.2 Méthode.....	52
II.11.2.1 Sous-cultures et incubations.....	52
II.12 Dosage de l'activité de l'enzyme CPT1.....	53
II.12.1 Préparation des extraits cellulaires enrichis en mitochondries.....	54
II.12.1.1 Principe.....	54
II.12.1.2 Méthode.....	54
II.12.2 Mesure de l'activité enzymatique de la CPT1.....	54
II.12.2.1 Principe.....	54
II.12.2.2 Méthode.....	55
II.13 Analyse statistique des résultats.....	55
III Résultats et discussion.....	56
III.1 Mise en évidence du phénotype adipocytaire et "adipocyte-like".....	57
III.2 Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ([ <sup>3</sup> H]-thymidine) par les cellules en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial.....	59
III.3 Mesure de l'incorporation d'acides gras et de glycérol par les cellules en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial.....	61

---



III.4 Mesure de la $\beta$ -oxydation des acides gras incorporés par les 3T3-L1 en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial.....	63
III.4.1 Résultats .....	64
III.4.2 Discussion.....	65
III.5 Quantification des taux de transcrits des différentes isoformes de la CPT (M-CPT1, L-CPT1 et CPT2) par la technique de "real time PCR" .....	66
III.5.1 Résultats .....	67
III.6 Mesure de l'activité de la CPT1 dans des cellules subissant un stress énergétique mitochondrial induit par l'antimycine A.....	68
III.7 Mesure de l'incorporation du 2-D-déoxyglucose tritié (2-[ $^3$ H]DG) par les 3T3-L1 en différenciation ou subissant un stress énergétique mitochondrial .....	72
III.7.1 Résultats .....	72
III.7.2 Discussion.....	72
III.8 Test de spécificité d'incorporation de 2-D déoxyglucose tritié (2-[ $^3$ H]DG)....	73
III.9 Mise en évidence de l'effet et de l'insuline, de la dexaméthasone et du cocktail inducteur de la différenciation sur l'incorporation de 2-D-déoxyglucose tritié (2-[ $^3$ H]DG). .....	75
III.10 Mise en évidence de l'abondance du transporteur au glucose GLUT1 en Western blotting.....	76
III.11 Mise en évidence de l'abondance des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 dans la membrane plasmique en immunofluorescence et microscopie confocale.	78
III.12 Effets de la wortmannine, du LY 294002 et de la cycloheximide sur l'incorporation de de 2-[ $^3$ H]DG induite par des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A.....	80
III.12.1 Résultats .....	80
III.13 Effets de la wortmannine, du LY 294002 et de la cycloheximide sur l'expression en membrane des transporteurs GLUT1 et GLUT4 de 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A.....	81
III.13.1 Discussion.....	81
III.14 Etude de l'activité transcriptionnelle de SREBP1 par transfection d'un système rapporteur luciférase .....	83
III.14.1 Résultats .....	84
III.14.2 Discussion.....	85
IV Conclusions et perspectives .....	86

---

V Bibliographie..... 92

---